Aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie
der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. G. Röhrborn)

Enzymcytochemische Untersuchungen während der Präimplantativen Entwicklung Parthenogenetischer und Normaler Mäuseembryonen

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von:
Martin Claßen

1983

UNIV.
LIBRARY
RIC

Aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie
der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. G. Röhrborn)

Enzymcytochemische Untersuchungen während der Präimplantativen Entwicklung Parthenogenetischer und Normaler Mäuseembryonen

---

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von:
Martin Claßen

1983

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan der
Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.:
Prof. Dr. Hopf

Referent
gez.:
Prof. Dr. Röhrborn

Korreferent
gez.
Prof. Dr. Beck

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL UND METHODEN	6
2.1. Versuchstiere	6
2.1.1. Hormonvorbehandlung	6
2.1.2. Erzeugung von Embryonen	6
2.1.2.a) normale Embryogenese	6
2.1.2.b) parthenogenetische Entwicklung (Elektrostimulation)	6
2.1.3. Gewinnung der Embryonen	7
2.2. Fixierung und Inkubation	8
2.2.1. Mg^{2+}-abhängige Adenosintriphosphatasen	9
2.2.2. saure Phosphatase	10
2.2.3. Endozytoseexperimente mit Meerrettichperoxidase	11
3. ERGEBNISSE	14
3.1. Vorversuche	14
3.1.1. Fixierung der Embryonen	14
3.1.2. Inkubationsdauer	15
3.1.2.a) Mg^{2+}-abhängige Adenosintriphosphatasen	15
3.1.2.b) saure Phosphatase	15
3.2. Entwicklung der Embryonen	16
3.3. Darstellung der Mg^{2+}-abhängigen Adenosintriphosphatasen	17
3.3.1. Normale Embryogenese	17
3.3.1.a) Erste Zeitstufe (21 Std. nach HCG) und Kontrollversuche zur Spezifität der Enzymdarstellung	17

		Seite
3.3.1.b)	Zweite Zeitstufe (62 Std. nach HCG)	19
3.3.1.c)	Dritte Zeitstufe (92 Std. nach HCG)	20
3.3.2.	Parthenogenetische Embryogenese	21
3.3.2.a)	Erste Zeitstufe (40 Std. nach HCG)	21
3.3.2.b)	Zweite Zeitstufe (90 Std. nach HCG)	22
3.3.2.c)	Dritte Zeitstufe (112 Std. nach HCG)	23
3.4.	Darstellung der sauren Phosphatase	24
3.4.0.	Kontrollversuche zur Spezifität der Enzymdarstellung	24
3.4.1.	normale Embryogenese	25
3.4.1.a)	Erste Zeitstufe (21 Std. nach HCG)	25
3.4.1.b)	Zweite Zeitstufe (62 Std. nach HCG)	26
3.4.1.c)	Dritte Zeitstufe (92 Std. nach HCG)	28
3.4.2.	Parthenogenetische Embryogenese	28
3.4.2.a)	Erste Zeitstufe (40 Std. nach HCG)	28
3.4.2.b)	Zweite Zeitstufe (90 Std. nach HCG)	29
3.4.2.c)	Dritte Zeitstufe (112 Std. nach HCG)	30
3.5.	Untersuchungen zur Endozytose (Meerrettichperoxidase)	31
3.5.1.	Lichtmikroskopische Untersuchungen	31
3.5.2.	Elektronenmikroskopische Untersuchungen	31
4.	DISKUSSION	33
5.	ZUSAMMENFASSUNG	57
6.	LITERATURVERZEICHNIS	60
7.	ANHANG (Tabellen und Abbildungen)	80

1. EINLEITUNG

Als Grundeigenschaft der Lebewesen ermöglicht die Fortpflanzung die Erhaltung der Arten und sichert durch die Generationenfolge den Fortbestand des Lebens. Neben der geschlechtlichen Fortpflanzung, die bei allen Stämmen des Tierreiches und speziell auch bei den Säugetieren verwirklicht ist, findet sich bei zahlreichen Tierarten auch eine eingeschlechtliche Entwicklung von Nachkommen (Parthenogenese), die PEACOCK (1952) als die "Erzeugung eines Embryo aus einer weiblichen Gamete ohne Einwirkung einer männlichen Gamete mit oder ohne Entwicklung zum adulten Lebewesen" beschreibt. Tierarten mit parthenogenetischer Entwicklung sind bestimmte Wirbellosenstämme (einige Plattwürmer, Saugwürmer, Rundwürmer), einige Gliederfüßler (Spinnen, Milben) sowie mehrere Insektengruppen (Stabheuschrecken, einzelne Schmetterlinge, Rüsselkäfer und Blattläuse); bei den Hymenopteren (Bienen, Wespen, Ameisen) entstehen die männlichen Tiere aus unbefruchteten Eiern (Übersicht bei MITTWOCH 1978). Die Parthenogenese tritt hier teilweise obligatorisch, teilweise fakultativ, aber auch zyklisch (Heterogonie) an die Stelle der sexuellen Fortpflanzung und hat in einigen Fällen Bedeutung für die Arterhaltung. Eindeutige Hinweise für eine parthenogenetische Entwicklung beim Säuger fanden sich hingegen erst spät. Nachgewiesen wurden zunächst nur auf wenige Schritte begrenzte spontane Teilungen unbefruchteter Eizellen (Maus: SLYE et al 1920; Meerschweinchen: HARMAN + KIRGRIS 1938; DEMPSEY 1939; Mensch: HÄGGSTRÖM 1922, KRAFKA 1939).
Bei bestimmten Mäusestämmen wie z.B. LT/ChReSv beobachteten STEVENS & VARNUM (1974) regelmäßig spontane parthenogenetische Entwicklungen von Oocyten. Von diesen parthenogenetischen Embryonen entwickelten sich einige bis zum Blastocystenstadium. Auch eine direkte experimentelle Erzeugung parthenogenetischer Embryonen aus Oocyten von Mäusen, Ratten und Kaninchen ist möglich (GRAHAM 1974) und erleichtert so Untersuchungen zur Parthenogenese. Hierzu haben sich ver-

schiedene Stimuli bewährt wie Kälte (PINCUS & SHAPIRO 1940; THIBAULT 1949; CHANG 1950, 1954 u.a.), Wärme (PINCUS & ENZMANN 1936; PINCUS 1939 a,b; BRADEN & AUSTIN 1954), osmotische Gradienten (PINCUS & ENZMANN 1936; PINCUS 1939 a, b), Hyaluronidase (GRAHAM 1970, 1971; GRAHAM & DEUSSEN 1974; KAUFMAN 1973, 1978; KAUFMAN et al 1977), Ätheranästhesie (THIBAULT 1949; BRADEN & AUSTIN 1954), Avertinanästhesie (KAUFMAN 1975), Inhibitoren der Proteinsynthese (SIRACUSA et al 1978), Injektion von Calcium (FULTON & WHITTINGHAM 1978) und Elektroschocks (TARKOWSKI et al 1970; WITKOWSKA 1973 a und b).

Parthenogenetische frühe Embryonen zeigen in ihrer Entwicklung morphologisch oft nur wenige Unterschiede zu normal befruchteten Embryonen. Beim Säuger ist der Verlauf der normalen Embryogenese grundsätzlich einheitlich: Die ovulierten Eizellen, umgeben von Zona Pellucida und Corona radiata, sammeln sich in der Pars ampullaris des Eileiters. Hier dringt das Spermium in die sekundäre Oocyte ein, die sich im Metaphase II-Stadium der Reifeteilung befindet. Mit der Penetration des Spermiums wird der Inhalt der Corticalgranula in den perivitellinen Raum ausgestoßen (AUSTIN 1956) und die Permeabilität der Zona pellucida verändert sich (INOUE & WOLF 1975). Nach der Reduplikation der DNA im männlichen und weiblichen Vorkern (Pronucleus-Stadium) schließt sich die erste mitotische Teilung an, die zum ersten Furchungsstadium, dem Zweizellstadium führt. Während der nun folgenden Weiterentwicklung vom Zweizeller über den Vierzeller und Achtzeller zum Morulastadium werden die Embryonen durch das Flimmerepithel der Tube in Richtung Uterus transportiert. Beim Übergang in den Uterus beginnt in der Morula eine Differenzierung der Blastomeren in Trophectoderm und innere Zellmasse (BLERKOM & MOTTA 1979; JOHNSON 1981). Mit der Bildung eines flüssigkeitsgefüllten Hohlraums sowie der Differenzierung des Embryoblasten und des umgebenden Trophoblasten wird das Stadium der Blastocyste erreicht. Nach dem

Schlüpfen aus der Zona pellucida wächst diese aktiv in die Uterusschleimhaut ein (DENKER 1977).

Die frühe parthenogenetische Embryogenese weist dagegen einige wichtige Besonderheiten auf. Das Fehlen des väterlichen Chromosomensatzes hat zur Folge, daß die Embryonen zunächst haploid sind. Bei einem Teil der Embryonen kommt es jedoch im Verlauf der Entwicklung zur Diploidisierung bzw. zur Bildung von Mosaiken aus haploiden und diploiden Zellen (TARKOWSKI et al 1970; WITKOWSKA 1973 a; GRAHAM & DEUSSEN 1974; KAUFMAN & GARDNER 1974; KAUFMAN & SACHS 1976). Die Untersuchung der frühen parthenogenetischen Embryonen auf lichtmikroskopischer (WITKOWSKA 1973 a) und elektronenmikroskopischer Ebene (SOLTER et al 1974) zeigte, daß Säugerparthenogenone zahlreiche normabweichende Veränderungen der Zelloberfläche, des Zytoplasmas und der Kernregion aufweisen. Hierzu gibt es jedoch widersprüchliche Befunde. So fanden VAN BLERKOM & RUNNER (1976) parthenogenetische Embryonen, die sich auch ultrastrukturell kaum von normalen Embryonen unterschieden.
Gesichert ist hingegen, daß viele Parthenogenone vor Erreichen des Blastocystenstadiums degenerieren (WITKOWSKA 1973a; GRAHAM 1970). Die morphologisch normalen Blastocysten sind in der Lage, eine deziduale Umwandlung der Uterusschleimhaut hervorzurufen (KAUFMAN & GARDNER 1974). Sie sterben aber bald darauf in einem hohen Prozentsatz ab (TARKOWSKI et al 1970; GRAHAM 1972; WITKOWSKA 1973 b; KAUFMAN et al 1977; KAUFMAN 1978). Zweifelsfreie Berichte über eine vollständige Entwicklung rein parthenogenetischer Individuen bis zur Geburt liegen nicht vor.
Über die Ursachen für die gestörte Entwicklung bestehen verschiedene spekulative Theorien. Möglicherwiese sind dabei mehrere Mechanismen wirksam. Eine wichtige Rolle könnte das Fehlen des paternalen Genmaterials oder die fehlende Übertragung von extrachromosomalen Bestandteilen des Spermiums spielen. Die weiterhin angeführte Vermutung, daß Homozygotie

von Letalgenen der Grund für das Absterben der Embryonen ist, erscheint nach neueren Veröffentlichungen unwahrscheinlich (HOPPE & ILLMENSEE 1977). Außerdem gibt es Hinweise für Störungen auf metabolischer Ebene, wofür die gestörte Aktivierung ribosomaler Gene spricht (HANSMANN et al 1978).

Die Klärung der Frage nach den Ursachen für die parthenogenetische Fehlentwicklung ist noch stärker in den Mittelpunkt gerückt, seitdem bekannt ist, daß ein bestimmter Tumor, das Teratom des Ovars, aufgrund parthenogenetischer Teilung von Eizellen entstehen könnte. Teratome können als gutartige Teratome auftreten, die nur aus differenzierten Geweben bestehen und nur begrenzt wachsen. Die malignen Teratome (Teratocarcinome) bestehen aus pluripotenten embryonalen Carcinomzellen, wachsen unbegrenzt und sind transplantabel. Ein ursächlicher Zusammenhang zwischen Teratomentstehung im Ovar und parthenogenetischer Entwicklung von Oocyten war schon von WALDEYER (1872) vermutet worden, fand eine Bestätigung jedoch erst durch die Untersuchungen von GALTON & BENIRSCHKE (1959), CORFMAN & RICHART (1967), LINDER (1969), LINDER & POWER (1970), LINDER et al (1975), STEVENS & VARNUM (1974) und EPPIG (1978). Interessant ist vor allem die Tatsache, daß zwischen Teratomentwicklung und parthenogenetischer bzw. normaler Embryogenese in der Anfangsphase erstaunliche morphologische Übereinstimmungen bestehen (STEVENS 1975). Erreicht aber ein Ovarialteratom ein Stadium, das dem Eizylinder entspricht, gerät das Wachstum außer Kontrolle und wird desorganisiert. Parthenogenetische Implantate im Uterus sterben hingegen in diesem Stadium ab, obwohl sie sich in der physiologischen Umgebung befinden.

Aus diesen Beobachtungen und aus den Untersuchungen der experimentellen Teratomforschung wird deutlich, daß die Teratomentstehung entweder auf Umgebungseinflüsse oder auf zelluläre (genetische, zytoplasmatische) Faktoren aufgrund der parthenogenetischen Aktivierung zurückzuführen ist

(DAMJANOV & SOLTER 1974 b; STEVENS 1981). Zur Erforschung der zellulären Ursachen für die Teratomentstehung bieten sich Untersuchungen an parthenogenetischen Embryonen an, da bei deren Untersuchung Milieueinflüsse weitgehend ausgeschlossen werden können. Zudem kann so genügend Untersuchungsmaterial gewonnen werden, was bei der Untersuchung von frühen Teratomstadien im Ovar wegen der geringen Inzidenz nur durch extrem umfangreiche Schnittserien möglich ist.

Die Parthenogenese als Sonderform der normalen Embryogenese ist aus genetischer und entwicklungsbiologischer Sicht von Interesse. Zudem sind Grundlagenuntersuchungen hierzu auch für die Teratom- und Teratocarcinomforschung von Bedeutung. Anliegen der vorliegenden Arbeit war deshalb, Enzymaktivitäten während der frühen normalen und parthenogenetischen Embryogenese zu vergleichen sowie die Endozytosefähigkeit trophoblastischer Zellen zu untersuchen.

2. MATERIAL UND METHODE

2.1 Versuchstiere

Alle Versuche wurden mit 10 - 12 Wochen alten Mäusen des Ramschzuchtstammes NMRI durchgeführt. Die Tiere entstammten der Zucht des zentralen Tierstalls der Universität Düsseldorf. Sie wurden vor und während des Versuchs unter standardisierten äußeren Bedingungen (Temp. 25°C, Beleuchtungsphasen von 6 Uhr bis 18 Uhr) gehalten und mit handelsüblichem Trockenfutter ernährt.

2.1.1. Hormonvorbehandlung

Zur Induktion einer Superovulation wird den weiblichen Tieren 5 IU PMS (Intergonan, Fa. Veterinär) jeweils um 17 Uhr injiziert. Hierauf folgt in 48-stündigem Abstand eine Injektion von 5 IU HCG (Predalon, Fa. Schering). Beide Substanzen werden intraperitoneal verabreicht.

2.1.2. Erzeugung von Embryonen

2.1.2. a) normale Embryogenese

Zur Erzeugung normaler Embryonen werden die Tiere am Abend nach der HCG-Injektion im Verhältnis ♂♂ : ♀♀ verpaart. Am folgenden Morgen wird der Paarungserfolg bewertet, indem das Vorhandensein eines Vaginalpfropfes überprüft wird.

2.1.2. b) Induktion parthenogenetischer Entwicklung

Die Aktivierung unbefruchteter Eizellen zur Parthenogenese

wurde durch Elektrostimulation nach der Methode von TARKOWSKI et al. (1970) vorgenommen. Dazu werden die Mäuse 20 Stunden nach der HCG-Injektion intraperitoneal mit Pentobarbital-Natrium (Nembutal, Fa. Deutsche Abbott) in einer Dosierung von 60 µg/g Körpergewicht narkotisiert und dann dorsolateral rasiert. Nach Desinfektion der Haut wird ein ca. 1 cm langer Hautschnitt in Höhe der Lendenwirbelsäule ca. 1 cm lateral der Medianlinie ausgeführt und Muskulatur, Faszie und Peritoneum schichtweise durchtrennt. Unter einem Binokular wird anschließend Ovar und Eileiter zur Elektrostimulation vorbereitet. Hierzu werden zwei Stahlnadeln als Elektroden flach an das obere und untere Ende der mit ovulierten Eizellen gefüllten Ampulle angelegt (Abb. 1).

Der Stromstoß erfolgte bei allen Versuchen mit einer Spannung von 40 Volt aus einem 8 µF Kondensator.

2.1.3 Gewinnung der Embryonen

Die normal befruchteten Tiere wurden jeweils 21h, 62h oder 92h nach der HCG-Verabreichung durch Genickbruch getötet. Mit den durch Stromstoß behandelten Mäusen wurde 20h, 70h oder 92h nach der Elektrostimulation (entspricht 40h, 90h und 112h nach HCG) ebenso verfahren (Abb.2). Auch das weitere Vorgehen war identisch:
Nach Entnahme von Ovar, Eileiter und Uterus werden diese in Blockschälchen mit 37°C warmem Ham's F 10 -Medium (Fa. Seromed) gegeben (Abb. 2). Dieses Medium wird bei allen weiteren Präparationsschritten benutzt. Das Ausspülen und Sammeln der Embryonen erfolgt mittels Mikropipetten mit Hilfe speziellen Mundschlauchs. Je nach Entwicklungsstadium erhält man die Embryonen entweder aus der Ampulle, dem Eileiter oder aus dem oberen Teil des Uterus (Abb. 4).

Blastocysten, deren Endozytosefähigkeit untersucht werden sollte, wurden wie oben beschrieben 92 Stunden nach HCG (normale Embryogenese) bzw. 112 Stunden nach HCG (Parthenegenese) aus dem Uterus gewonnen. Anschließend wurden sie in MEM (Minimal Essential Medium; Fa. Seromed, München) mit 20 % fetalem Kälberserum (Fa. Seromed, München) bei 37°C und 5 % CO_2 unter Paraffinöl bis zum spontanen Ausschlüpfen aus der Zona pellucida kultiviert und dann für die Untersuchungen zur Endozytose aus dem Kultivierungsmedium entnommen.

2.2 Fixierung und Inkubation

Um eine Verdunstung der chemisch labilen Fixierungs- und Inkubationslösungen zu vermeiden, wurden diese Versuchsschritte unter Paraffinöl durchgeführt. Alle Manipulationen mußten wegen der geringen Größe der Embryonen unter einem Binokular mit Hilfe von Mikropipetten erfolgen (Abb. 2). Zur mikroskopischen Bewertung der Embryonen und zur fotografischen Dokumentation stand ein Umkehrmikroskop der Fa. Leitz mit Orthomat-Kamera (automatische Belichtungssteuerung) zur Verfügung. Als Filmnegativmaterial fand der panchromatische Film Technical Pan SO 115 (Fa. Kodak) Verwendung. Zur Vermeidung unspezifischer Niederschläge wurden alle Inkubationslösungen für die cytochemischen Enzymnachweise vor Gebrauch 12 Stunden bei 20°C belassen (Ausfällung überschüssigen Bleinitrats), der pH der Inkubationslösung unmittelbar vor der Anwendung justiert und die Lösungen kurz vor Gebrauch über einen 0,2 µm Membranfilter gegeben.

2.2.1. cytochemische Darstellung der Mg^{2+}-abhängigen Adenosintriphosphatasen

a) Fixierung (HÜNDGEN 1968 a)

Gepufferte (0,1 mol/l Trismaleat, pH 7,4) 4%ige Formaldehydlösung (1,33 mol/l) mit 40 g/l Saccharose (0,12 mol/l); 30 Minuten, 4° C (aus Paraformaldehyd durch Depolimerisation frisch hergestellt).

b) Wässerung

0,1 mol/l Trismaleatpufferlösung, pH 7,0 mit 83 g/l Saccharose (0,24 mol/l); 6 x 5 Minuten.

c) Vorinkubation

0,64 g/l ATP.Na_2 (Fa. Serva) und 2,622 g/l $MgSO_4.7H_2O$ in 0,1 mol/l Trismaleatpufferlösung pH 7,0 mit 83 g/l Saccharose; 5 Minuten, 22° C.

d) Inkubation (nach WACHSTEIN & MEISEL 1957; modifiziert v. HÜNDGEN 1968 a,b)

0,605 g/l ATP.Na_2 (1 mmol/l), 2,465 g/l $MgSO_4 . 7 H_2O$ (10 mmol/l) und 1,16 g/l $Pb(NO_3)_2$ (3,5 mmol/l) in 0,1 mol/l Trismaleatpufferlösung pH 7,0 mit 83 g/l Saccharose (0,24 mol/l); 5 Minuten (in einigen Versuchen 10 Min. siehe Ergebnisse), 22° C.

e) Wässerung

wie unter Punkt b) beschrieben.

f) Kontrastierung

8 g/l Ammoniumsulfit (118 mmol/l) in 0,1 mol/l Trismaleatpuffer mit 83 g/l Saccharose; 3 Minuten, 22 ^{o} C.

g) Wässerung

siehe Punkt b).

2.2.2. cytochemische Darstellung der sauren Phosphatase

a) Fixierung (HÜNDGEN 1968 a)

Gepufferte (0,1 mol/l Trismaleat, pH 7,4) 2%ige Glutaraldehydlösung (0,2 mol/l) mit 69 g/l Saccharose (0,20 mol/l); 30 Minuten, 4^{o} C.

b) Wässerung

0,1 mol Trismaleatpufferlösung pH 7,0 mit 69 g/l Saccharose, 2 x 5 Minuten; anschließend 0,1 mol/l Trismaleatpuffer pH 5,2 mit 69 g/l Saccharose; 6 x 5 Minuten.

c) Vorinkubation

3 g/l Na-ß-Glycerophosphat (Fa. Fluka) (9,5 mmol/l) in 0,1 mol/l Trismaleatpufferlösung pH 5,2 mit 69 g/l Saccharose; 5 Minuten bei 37 ^{o} C.

d) Inkubation (nach GOMORI 1941 a,b; modifiziert v. HÜNDGEN 1968 a,b)

2,4 g/l Na-ß-Glycerophosphat (7,6 mmol/l) und 1,2 g/l $Pb(NO_3)_2$ (3,6 mmol/l) in 0,1 mol/l Trismaleatpuffer

pH 5,2 mit 69 g/l Saccharose (0,2 mol/l); 3 Stunden, 37° C.

e) Wässerung

0,1 mol/l Trismaleatpuffer pH 5,2 mit 69 g/l Saccharose, 10 Minuten; anschließend 0,1 mol/l Trismaleatpuffer pH 7,0 mit 69 g/l Saccharose; 6 x 5 Minuten.

f) Kontrastierung

8 g/l Ammoniumsulfit (118 mmol/l) in 0,1 mol/l Trismaleatpuffer mit 69 g/l Saccharose; 3 Minuten.

g) Wässerung

0,1 mol/l Trismaleatpuffer pH 7,0 mit 69 g/l Saccharose; 6 x 5 Minuten.

2.2.3 Untersuchung zur Endozytose von Meerrettichperoxidase (MPO)

a) Verfütterung der Meerrettichperoxidase

Nach Schlüpfen der Blastocysten (siehe 2.1.3.) Verfütterung von 0,01 % Meerrettichperoxidase (Fa. Serva, Heidelberg) bei 37° C und 5 % CO_2 unter Paraffinöl für 2 und 4 Stunden.

b) Fixierung (HÜNDGEN & WEISSENFELS 1973)

Gepufferte (0,1 mol/l Phosphatpuffer, pH 7,4) 2%ige Glutaraldehydlösung (0,2 mol/l) mit 69 g/l Saccharose (0,20 mol/l); 60 Minuten bei 20° C.

c) Wässerung

0,1 mol/l Phosphatpufferlösung pH 7,4 mit 69 g/l Saccharose; 5 x 10 Minuten. Anschließend 0,1 mol/l Tris-HCl-Pufferlösung p 7,6 mit 69 g/l Saccharose; 3 x 10 Minuten.

d) Vorinkubation

1 g/l 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (Fa. Serva, Heidelberg) in 0,1 mol/l Tris-HCl-Pufferlösung pH 7,6 mit 69 g/l Saccharose; 30 Minuten bei 20° C im Dunkeln.

e) Inkubation (nach GRAHAM & KARNOVSKY 1966 modofiziert v. THEMANN et al 1971)

1 g/l 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid und 15 ml H_2O_2 (1%ig) pro Liter in 0,1 mol/l Tris-HCl-Pufferlösung pH 7,6 mit 69 g/l Saccharose; 45 Minuten bei 20° C im Dunkeln.

f) Wässerung

0,1 mol/l Tris-HCl-Pufferlösung pH 7,6 mit 69 g/l Saccharose; 6 x 10 Minuten.

g) Wässerung

0,1 mol/l Phosphatpufferlösung pH 7,4 mit 69 g/l Saccharose, 3 x 5 Minuten.

h) Kontrastierung und Stabilisierung

10 g/l OsO_4 in 0,1 mol/l Phosphatpufferlösung pH 7,4 mit 69 g/l Saccharose; 1 Stunde bei 4° C.

i) Entwässerung

Äthylalkoholreihe vom 15%igen bis zum absoluten Alkohol in 7 Stufen, insgesamt 3,5 Stunden bei 20° C.

j) Nachkontrastierung

1% Phosphorwolframsäure und 1% Uranylacetat im 70%igen Alkohol der Entwässerungsreihe, 2 Stunden.

k) Einbettung

Styrol-Methacrylat

l) Lichtmikroskopie

Lichtmikroskopische Auswertung im Einbettungsmittel (Styrol-Methacrylat) mit Umkehrmikroskop (Fa. Leitz) mit Orthomat-Kamera.

m) Elektronenmikroskopie

Nach Herstellung von Ultradünnschnitten (LKB-Ultrotome) elektronenmikroskopische Analyse (Zeiss EM 9).

3. ERGEBNISSE

3.1 Vorversuche

3.1.1 Fixierung der Embryonen

Entsprechend den Hinweisen aus der Literatur wurden in Vorversuchen Formaldehyd- und Glutaraldehydfixierungen in verschiedenen Konzentrationen unter Variation der Fixierungsdauer ausgetestet. Hierbei wurde auf einen Kompromiß zwischen einer noch ausreichenden Strukturerhaltung und einer guten Nachweisbarkeit der Enzyme Wert gelegt. Elektronenmikroskopische Befunde, die HÜNDGEN & WEISSENFELS (1973) bei Verwendung dieser Fixierungsmittel erhoben hatten, wurden dabei berücksichtigt. Als brauchbar erwies sich zum Nachweis der Mg^{2+}-abhängigen ATPasen eine dreißigminütige Fixierung in 4% Formaldehydlösung bei 4° C. Für die Darstellung der sauren Phosphatase bewährte sich eine dreißigminütige Fixierung in 2% Glutaraldehydlösung bei 4° C.

Die Strukturerhaltung nach der Fixierung unterschied sich bei den beiden verwendeten Fixierungsmitteln. Die Verwendung von Glutaraldehyd ergab insgesamt eine bessere Qualität der fixierten Embryonen, insbesondere waren die Zellkerne klar abgegrenzt und deutlich erkennbar. Bei den frühen Furchungsstadien traten auch die Zellgrenzen deutlich heraus, vom Stadium der Morula an waren diese nicht mehr sichtbar. Die Formaldehyd-Fixierung bewirkte eine grobere Granulierung des Zytoplasmas, Zellkerne waren oft nicht mehr so eindeutig erkennbar. Außerdem trat bisweilen eine geringe Schrumpfung des Embryos innerhalb der Zona pellucida auf.

3.1.2. Inkubationsdauer

3.1.2.a) Mg^{2+}-abhängige Adenosintriphosphatasen

Die optimale Dauer der Inkubation für den Enzymnachweis wurde in Vorversuchen an Embryonen der normalen Embryogenese überprüft. Es zeigte sich, daß die ursprünglich für menschliche Fibroblastenzellen günstige Inkubationszeit von 3 Stunden wegen der höheren ATPase-Aktivität der Embryonen stark reduziert werden mußte. Die Inkubationsdauer mußte auf 5 Minuten bei 22° C festgelegt werden.

3.1.2. b) saure Phosphatase

Die Länge der Inkubation wurde ausgehend von dem für menschliche Fibroblasten gültigen Wert von 3 Stunden in Vorversuchen an Embryonen der normalen Embryogenese untersucht. Bei einer identischen Inkubationszeit und einer Temperatur von 37° C ergab sich eine ausreichend intensive Darstellung der embryonalen Enzymaktivität. Auf eine Verlängerung der Inkubation wurde zur Vermeidung unspezifischer Begleitreaktionen verzichtet.

3.2. Entwicklung der Embryonen

Die zu einem bestimmten Zeitpunkt zahlreich gewonnenen Embryonen weisen jeweils ein gewisses Entwicklungsspektrum auf. So finden sich in der normalen Embryogenese 62 Stunden nach HCG neben Vierzellern auch solche, die noch Zweizeller und andere, die schon 8-Zeller sind. Um eine Untersuchung aller Entwicklungsstadien der präimplantativen Embryogenese zu ermöglichen, wurden drei geeignete Zeitstufen zur Entnahme der Embryonen ermittelt. Normal befruchtete Embryonen wurden danach 21 Stunden, 62h oder 92 Stunden nach der HCG-Injektion, parthenogenetisch aktivierte 40 Stunden, 90 Stunden oder 112 Stunden nach HCG gewonnen (Abb. 3).

In den jeweiligen Zeitstufen wurden die entnommenen und fixierten Embryonen ausgezählt und ihr Entwicklungsstadium bestimmt.
Interessant ist vor allem ein Vergleich zwischen normaler und parthenogenetischer Entwicklung (Tablellen 1 und 2). Hierbei fällt auf, daß die Streuung bei den parthenogenetischen Embryonen deutlich größer ist. Verglichen mit der normalen Embryogenese ist eine deutliche Entwicklungsverzögerung bei Parthenogenonen zu verzeichnen (Abb.5 A-C).

Beim Ausspülen parthenogenetischer Embryonen fiel weiterhin auf, daß Embryonen an Stellen des Eileiters bzw. Uterus anzutreffen waren, die nicht ihrem Entwicklungsstand entsprachen. So fanden sich 2-Zell-Stadien bereits im Uterus. Die Zahl der durch Stromstoß aktivierten Embryonen (Parthenogenone) verringerte sich im Laufe der Entwicklung deutlich. Neben morphologisch normalen waren zahlreiche degenerativ veränderte Parthenogenone nachweisbar. Als Zeichen der Degeneration wurden entweder untypische Blastomerenabschnürungen oder eine Auflösung der Zellmatrix angesehen. Als morphologisch normal wurden diejenigen parthenogenetischen

Embryonen klassifiziert, die lichtmikroskopisch im ungefärbten Zustand keine Unterschiede zu den durch Befruchtung entstandenen erkennen ließen.

3.3. Darstellung der Mg^{2+}-abhängigen Adenosintriphosphatasen

3.3.1. normale Embryogenese

ATPase-Aktivität konnte bei allen untersuchten Stadien der normalen Embryogenese nachgewiesen werden. Zwischen den verschiedenen Stadien zeigten sich jedoch Unterschiede in Intensität und Verteilung der enzymatischen Nachweisreaktion. Bei allen Embryonen war die Zona pellucida ohne Präzipitate, was neben den Kontrollversuchen zur enzymatischen Spezifität als Kriterium eines spezifischen Enzymnachweises gewertet wird.

3.3.1. a) Erste Zeitstufe (21 Std. nach HCG) und Kontrollversuche zur Spezifität der Enzymdarstellung

Die enzymatische Aktivität von Eizellen vor der Befruchtung war nicht zu beurteilen, da diese mit dicht gepackten Corona-Radiata-Zellen umgeben waren. Erschwerend kommt die hohe ATPase-Aktivität der Coronazellen hinzu, die durch enzymatisches Reaktionsprodukt nahezu lichtundurchlässig waren (Abb. 9A). Kam es im Laufe der Alterung oder infolge der Befruchtung zu einer Auflockerung der Follikelzellen, war im Bereich der Corona radiata die Mg^{2+}-abhängige ATPase weniger deutlich nachweisbar (Abb. 9A).
Pronuclei, die hierauf folgenden Stadien, waren deutlich ATPase-Aktiv. Um im Mikroskop sichtbare Bereiche hoher und

niedriger enzymatischer Aktivität darstellen zu können, mußte bei der Vergrößerung der fotografischen Negative die Belichtungszeit stark verkürzt werden. Hierdurch kam die ungleiche Verteilung der enzymatischen Reaktion deutlicher zum Ausdruck, nicht kontrastierte Strukturen wie die Zona pellucida hingegen waren dann nicht mehr darzustellen (Abb. 7 A; 9 B; 13 A). Ein Vorkern war in keinem Fall zu erkennen. Die Bereiche hoher enzymatischer Aktivität waren vorwiegend in der Zellperipherie lokalisiert und wirkten schalen- oder kappenartig. Daneben war in Bereichen geringerer Enzymaktivität granuläre Reaktionen diffus verteilt, die allmähliche Übergänge aber zuweilen auch scharfe Abgrenzungen gegenüber den stark kontrastierten Zonen aufwiesen (Abb. 6 C, 9 B). Der perivitelline Raum, in einigen Fällen auch der gesamte extrazelluläre Raum war von dunklen Granula unterschiedlicher Dichte angefüllt (Abb. 7 A, 13 A). Der Polarkörper hingegen war nur wenig enzymatisch aktiv (Abb. 7 A).

Um entscheiden zu können, welche der beschriebenen Kontrastierungen Ergebnis der enzymatischen Aktivität der Mg^{2+}-abhängigen ATPasen sind, wurden Kontrollversuche durchgeführt. Dabei wurden Embryonen der ersten Zeitstufe entweder ohne das Substrat ATP oder ohne Magnesium als Cofaktor inkubiert. Um zusätzliche Hinweise über Zentren unspezifischer Reaktionen zu erhalten, wurde überdies in einer Serie der Kontrollen die Inkubationszeit verdoppelt. Fehlte ATP als Substrat der enzymatischen Reaktion bei sonst unverändertem Inkubationsmedium war nahezu keine Färbung zu beobachten (Abb. 6 D). Ein Vergleich mit Embryonen vor der Inkubation zeigt, daß auch bei diesen kleinere dunklere Bereiche oder Granula sichtbar waren (Abb. 6 A, 6 B). Die Corona-radiata-Zellen zeigten keine Bleisulfidpräzipitate (Abb. 6 D).

Nach der Inkubation der Pronuclei mit Mg^{2+}-freiem Medium zeigte sich eine extrem schwache granuläre Reaktion (Abb.6E, F, G). Unterschiede im Vergleich zu Pronuclei vor der Inkubation waren kaum vorhanden. Bisweilen fielen zusätzlich Bezirke mit etwas verstärkter Anfärbung in der Zellperipherie auf. Einige Pronuclei zeigten kleine stärker kontrastierte Bereiche, deren Zuordnung zu intra- oder extrazellulären Strukturen nicht eindeutig möglich war (Abb.6 G). Allerdings sind Zentren hoher unspezifischer oder Mg^{2+}-unabhängiger Enzymaktivität offensichtlich im Bereich des perivitellinen Raums vorhanden (Abb. 6 E, F).
Zona pellucida und Follikelzellen zeigten keine erkennbaren Kontraststeigerungen (Abb. 6 E, F, G).

3.3.1. b) Zweite Zeitstufe (62 Std. nach HCG)

Zur zweiten Zeitstufe kamen neben Pronuclei auch 2-Zeller, 3-Zeller und 4-Zeller vor. Die Pronuclei zeigten die gleiche Aktivitätsverteilung und -intensität wie diejenigen, die 40 Stunden jünger waren (Abb. 13 B, C).
Bei den Zweizellern hatte das Reaktionsprodukt den gleichen grobgranulären Charakter und war vor allem in der Peripherie der Zellen ausgeprägt mit einer Verstärkung in den einander zugewandten Bereichen der Blastomerenmembran (Abb. 7 B; 9 C, D). Einige Granula schienen auch extrazellulär im Raum zwischen Embryo und Zona pellucida lokalisiert zu sein (Abb. 9 C, D). Wiederum war die Reaktion im Bereich des Polarkörpers besonders konzentriert (Abb. 9 C, D). Die Drei- und Vierzeller ähnelten diesem Bild mit gewissen interindividuellen Unterschieden. Dichte Bleisulfidansammlungen in dem Teil der Zellen, der an andere Zellen grenzt sowie dunkle Granula im extrazellulären Raum waren auch hier zu sehen (Abb. 7 C; 10 A, B, C). Deutliche enzymatische

Unterschiede zwischen einzelnen Blastomeren waren bei keinem Embryo vorhanden. Bei den wenigen degenerativen Embryonen derselben Entwicklungszeit war die Reaktion etwas schwächer und nicht so typisch verteilt wie bei den regulären Embryonen. Einige degenerative Embryonen mit nahezu fehlender Aktivität fielen besonders auf. Bei wenigen Embryonen waren Zellkerne schwach als ringförmig dichtere Strukturen im Zentrum der Blastomeren zu erkennen (Abb. 10 B).
Ein Vergleich der enzymatisch aktiven Stadien untereinander ließ keine stadienspezifischen Aktivitätsunterschiede erkennen. Bei allen untersuchten Stadien waren neben Embryonen mit geringer Reaktionsintensität solche mit extrem hoher zu finden. Überwiegend war eine starke Reaktion anzutreffen, die ähnlich ausgeprägt war wie bei Embryonen, die 21 Stunden nach HCG gewonnen wurden.

3.3.1. c) Dritte Zeitstufe (92 Std. nach HCG)

Bei der Untersuchung von Stadien 92 Stunden nach HCG zeigte sich mit zunehmendem Embryonenalter ein deutliches Nachlassen der ATPase-Aktivität. Davon waren neben den Morulae und Blastocysten auch einige noch vorhandene Achtzellstadien betroffen. Neben Blastocysten und Morulae fand sich auch ein typischer Pronucleus, der noch eine Aktivitätsverteilung wie Pronuclei 21 oder 62 Stunden nach HCG aufwies (Abb. 13 D). Die Stärke der enzymatischen Reaktion war jedoch weitaus geringer als bei Pronuclei der ersten und zweiten Zeitstufe (Abb. 13). Achtzeller und Zwölfzeller waren schwächer enzymatisch aktiv, jedoch ausgeprägter als Morula-Stadien. Eine Lokalisation des granulären Niederschlags innerhalb der einzelnen Blastomeren in Morulae oder Blastocysten war mit lichtmikroskopischen Mitteln nicht mehr

eindeutig möglich. Auch die Blastocysten wiesen eine nur geringe Enzymaktivität auf (Abb. 7 E, F; 11 C; 12 A,B,C). Um genauere Aussagen über Art und Lokalisation der Reaktionen machen zu können, wurden einige Embryonen auch mit verdoppelter Inkubationszeit (10 Minuten) untersucht. Der Embryoblast war geringfügig stärker enzymatisch aktiv als der Trophoblast, wobei vor allem an der Oberfläche der Trophoblastzellen zum Blastocoel hin kein deutlicher ATPase-Nachweis möglich war. Die nach außen weisenden Membranen des Trophoblasten waren hingegen deutlich stärker ATPase-aktiv (Abb. 7 F; 12 A, B, C).
Insgesamt geht mit der fortschreitenden Entwicklung der praeimplantativen Embryonen eine deutliche Abnahme der ATPase-Aktivität einher, wobei Morulae und Blastocysten die geringste Enzymaktivität aufweisen (Abb. 7).

3.3.2. Parthenogenetische Embryogenese

Die Untersuchung der ATPase-Aktivität in der praeimplantativen parthenogenetischen Embryogenese ergab, daß ebenso wie in der normalen Embryogenese die frühesten Stadien die höchste Enzymaktivität aufweisen, während Morulae und Blastocysten deutlich geringer ATPase-aktiv sind (Abb. 8).

3.3.2. a) Erste Zeitstufe (40 Std. nach HCG)

Unter den frühesten untersuchten Parthenogenonen fanden sich 20 Stunden nach Elektrostimulation (40 Std. nach HCG) neben Pronuclei mit meist abgelösten Coronazellen 2-, 3- und 4-Zeller. Sie zeigten wie vergleichbare Stadien der normalen Embryogenese deutliche Mg^{2+}-abhängige ATPase-Aktivität. Die Verteilung des enzymatischen Reaktionsproduktes

entsprach weitgehend der normalen Embryogenese. Für die Pronuclei war eine granuläre, vorwiegend peripher lokalisierte Reaktion charakteristisch. Ebenso wie bei normal befruchteten Pronuclei wechselten Bereiche extrem hoher mit solchen mittlerer Aktivität ab (Abb. 8 A; 9 E). Die Abgrenzung der stärker ATPase-aktiven Bereiche gegenüber Bereichen geringer Aktivität war allerdings etwas weniger deutlich. Bei den morphologisch normalen 2-4-Zellern war neben der zytoplasmatischen Reaktion wiederum im Raum zwischen den Blastomeren Reaktionsprodukt zu sehen. Auch zwischen den Blastomeren und der Zona pellucida traten einige dunkle Granula auf (Abb. 9 F). Zwischen den Blastomeren eines Embryos bestanden keine enzymatischen Aktivitätsunterschiede. Bei einigen morphologisch abnormen Embryonen waren hingegen enzymatisch unterschiedlich aktive Blastomeren zu beobachten.

Ein Vergleich der Dichte der Bleipräzipitate als Maß für die Aktivität der ATPasen ergab eine durchschnittlich hohe Aktivität von Embryonen der normalen Embryogenese (21 Std. und 62 Std. nach HCG) und der entsprechenden Parthenogenone 40 Std. nach HCG.

3.3.2. b) Zweite Zeitstufe (90 Std. nach HCG)

Ältere parthenogenetische Embryonen (90 Std. nach HCG bzw. 70 Std. nach Elektrostimulation),deren Mg^{2+}-abhängige ATPase-Aktivität untersucht wurde, zeigten durchweg eine deutliche enzymatische Reaktion. Die Verteilung der Enzymaktivität bei den 2-, 3-, 4- und Mehrzellern war nahezu identisch mit den entsprechenden Stadien der normalen Embryogenese (Abb. 8 B,C,D; 9 G; 10 D,E,F; 11 D,E). Im Gegensatz zur normalen Embryogenese waren die enzymatischen Reaktionsprodukte allerdings weniger scharf abzugrenzen.

Die Bleisulfidpräzipitate traten vermehrt im Raum zwischen Embryo und Zona pellucida auf (Abb. 9 G; 10 D, E, F). Nach mechanischer Entfernung der Zona pellucida sind diese extrazellulären Reaktionsprodukte nicht mehr anzutreffen (Abb. 11 F).
Degenerative Embryonen waren durchweg ATPase-aktiv, allerdings waren starke enzymatische Reaktionen nur in bestimmten Bereichen der Zellen zu finden. Auch kleinere Blastomerenabschnürungen wiesen deutliche Enzymaktivitäten auf.
Ein Vergleich der parthenogenetischen Embryonen 90 Stunden nach HCG mit normalen Embryonen 92 Stunden nach HCG (dritte Zeitstufe) zeigte, daß diese Parthenogenone eine höhere Aktivität der Mg^{2+}-abhängigen ATPasen aufweisen als stadienentsprechende befruchtete Embryonen.

3.3.2. c) Dritte Zeitstufe (112 Std. nach HCG)

Parthenogenone, die 112 Stunden nach HCG bzw. 92 Stunden nach Stimulation noch morphologisch intakt waren, zeigten eine deutliche Abnahme der ATPase-Aktivität. Auch ein Vierzellembryo war zu diesem Zeitpunkt enzymatisch kaum aktiv. Die untersuchten Blastocysten zeigten durchweg eine schwache Enzymreaktion. Auch im Bereich des Embryoblasten war keine Kontraststeigerung zu beobachten. Am Trophoblasten waren vor allem in den nach außen weisenden Membranbezirken eine Mg^{2+}-abhängige ATPase-Aktivität auffallend (Abb. 12 D, E).

Im Gegensatz zu früheren Stadien waren im Raum außerhalb der Blastomeren keine ATPase-aktiven Granula sichtbar. Verglichen mit stadienentsprechenden normalen Embryonen (92 Std. nach HCG) wiesen parthenogenetische Embryonen 112 Std. nach HCG eine etwas geringere enzymatische Gesamtaktivität auf. Es sollte jedoch berücksichtigt werden, daß es sich dabei um vergleichweise hohe embryonale Enzymaktivi-

vitäten handelt. Embryonale Zellen zeigen im Vergleich mit Zellen adulter Gewebe offensichtlich eine vielfach höhere ATPase-Aktivität, was beim Vergleich der unterschiedlichen Inkubationszeiten (5 Min. und 3 Stunden) auffällt.

3.4 Darstellung der sauren Phosphatase

Alle praeimplantativen normalen und parthenogenetischen Embryonen waren sPase-aktiv, jedoch zeigten sich Enzymaktivitätsunterschiede. Die Stärke dieser enzymatischen Reaktion entspricht in etwa der in Fibroblasten von adulten Mäusen (eigene Voruntersuchungen). In Zellen des Genitaltraktes der weiblichen Maus jedoch konnten deutlich höhere Enzymaktivitäten beobachtet werden (Abb. 14 C). Eindeutige stadienspezifische Aktivitätsunterschiede waren in der praeimplantativen Entwicklung nicht nachweisbar. Enzymatisch unterschiedlich reaktive Blastomerenbereiche sowie z.T. fehlende Enzymaktivitäten in einzelnen Blastomeren parthenogenetischer Embryonen konnten hingegen beobachtet werden. Bei allen Embryonen war die Zona pellucida frei von Bleinitratpräzipitaten.

3.4.0. Kontrollversuche zur Spezifität der Enzymdarstellung

Zur Überprüfung der Spezifität der angewendeten Enzymdarstellung wurde neben Kontrollen ohne das Substrat Na-ß-Glycerophosphat eine Kontrollserie unter Zugabe von 0,01 Mol/l Natriumfluorit als Enzymhemmstoff untersucht. Alle Kontrollversuche wurden an Blastocysten der normalen

Embryogenese durchgeführt, bei denen die Verwendung des vollständigen Inkubationsgemisches eine deutliche enzymatische Farbreaktion ergeben hatte. Eine Inkubation ohne Na-ß-Glycerophosphat hatte ein nahezu völliges Fehlen eines Reaktionsproduktes in den Blastocysten zur Folge. Lediglich der Embryoblast zeigte eine extrem schwache Reaktion, der Trophoblast blieb ungefärbt (Abb. 14 D). Auch degenerative Embryonen waren reaktionsfrei. Die Zona pellucida war bei allen untersuchten Embryonen nicht angefärbt. Nach Zugabe von Natriumfluorit zum Inkubationsmedium waren keine nennenswerten Bleipräzipitate als Folge einer enzymatischen Aktivität nachweisbar. Insbesondere der Embryoblast zeigte im Gegensatz zu den Kontrollen ohne Substrat keine Reaktion (Abb. 14 E). Alle degenerativen Stadien waren nicht angefärbt. Zona pellucida und extrazellulärer Raum waren bei allen Embryonen ohne Reaktionsprodukt.

3.4.1. normale Embryogenese

3.4.1. a) Erste Zeitstufe (21 Std.nach HCG)

Unter frühen Embryonen 21 Std. nach HCG (Pronuclei) fanden sich einzelne mit starker sPase-Aktivität (Abb. 17 C, E), andere waren dagegen weniger sPase-aktiv (Abb. 17 D). Bei Pronuclei mit enganliegenden Corona radiata-Zellen war die Stärke der enzymatischen Reaktion oft nicht klar bewertbar. Innerhalb der Corona radiata fanden sich vorwiegend geringere enzymatische Aktivitäten (Abb. 17 C, D, E). Das Reaktionsprodukt des Enzymnachweises war feingranulär und nahezu über das gesamte Zytoplasma verteilt (Abb. 15 A; 17 C, D, E). Neben dieser diffusen Reaktion fielen auch etwas größere deutlicher begrenzte granuläre Strukturen auf (Abb. 15 A; 17 D). Diese Zentren offensichtlich höherer

enzymatischer Aktivität waren ebenfalls nahezu gleichförmig über die gesamte Zelle verteilt. Die deutliche Kontraststeigerung im Bereich der Zellmembran ist wahrscheinlich nicht auf enzymatische Reaktionen zurückzuführen, da Embryonen vor dem Enzymnachweis ebenfalls diese Auffälligkeit zeigten. Bei einigen Pronuclei waren neben den bereits beschriebenen granulären Strukturen größere kreisförmige dunklere Formationen zu erkennen, die an Vorkerne erinnern (Abb. 15 A; 17 D, E). Wenn Polarkörper mikroskopisch klar abzugrenzen waren, waren diese weniger dunkel gefärbt als das Zytoplasma der Eizelle. Bisweilen fanden sich auch in den Polarkörpern einzelne dunklere Strukturen, die nach Größe und Form Zellkernen entsprechen könnten (Abb. 17 D, E). Neben morphologisch normal strukturierten Embryonen fanden sich auch solche mit stark fragmentiertem und zerklüfteten Zytoplasma. Diese degenerativen Embryonen waren schwächer aktiv als vergleichbare normal entwickelte Pronuclei (Abb. 22 A). Unbefruchtete Eizellen ließen 21 Std. nach HCG hinsichtlich der Reaktionsintensität keine Unterschiede zu befruchteten Eizellen gleichen Alters erkennen (Abb. 17 A, B). Neben der bereits beim ATPase-Nachweis beobachteten dichteren Anordnung der Corona radiata nicht befruchteter Oocyten fiel auf, daß in keinem Fall zellkernähnliche Strukturen zu sehen waren.

3.4.1. b) Zweite Zeitstufe (62 Std. nach HCG)

50 Stunden nach der Befruchtung (62 Std. nach HCG) fanden sich nach Durchspülung des Eileiters Einzeller, Zweizeller, Dreizeller, Vierzeller, Achtzeller und frühe Morulae. Nach der Inkubation von Pronuclei auf saure Phosphatase waren enzymatisch aktive Bereiche ähnlich verteilt wie bei den 41 Stunden jüngeren bereits beschriebenen stadienentsprechenden Embryonen. Starke Enzymaktivitäten, die bei einigen

Pronuclei 21 Stunden nach HCG zu beobachten waren, fanden sich auch 62 Stunden nach HCG (Abb. 18 A). Auch ältere Embryonen (2-, 3-, 4-, 8- und 10-Zeller zeigten diese vergleichsweise schwache bis mittelstarke Reaktion (Abb. 15 B,C,D; 19 A, B,C). Bei einigen Embryonen waren jedoch einzelne Blastomeren unterschiedlich enzymatisch aktiv (Abb. 15 C; 18 B). Die Zellkerne waren bei vielen Zellen stark kontrastiert (Abb. 15 D; 18 B; 19 A,B,C). Andere Embryonen wiesen im Zellkernbereich nur mehrere kontrastreiche kreisförmige Bereiche auf (Abb. 15 B). In den Polarkörpern der älteren Embryonen fanden sich ebenso wie 21 Stunden nach HCG geringe enzymatische Aktivitäten. In einem bereits zur Morula weiterentwickelten Embryo war die sPase-Aktivität offensichtlich deutlich abgeschwächt. Degenerative Embryonen mit Blastomerenabschnürung unterschiedlicher Größe oder Auflösung einzelner Blastomeren zeigten sowohl Bereiche schwacher als auch fehlender Enzymaktivität (Abb. 22 B, C). Die Zellkerne dieser degenerativen Stadien waren weniger häufig als bei morphologisch normalen Embryonen kontrastreich vom übrigen Zytoplasma abzugrenzen (Abb.22 B). Degenerative Embryonen ohne Zellgrenzen waren diffus kontrastiert; diese Kontraste waren jedoch nicht auf enzymatische Aktivität zurückzuführen, weil diese Embryonen vor und nach der Inkubation auf saure Phosphatase das gleiche Bild boten.

Bei Mäusen ohne Vaginalpfropf (erfolglose Verpaarung) wiesen alle Embryonen nach 62 Stunden Zeichen der Degeneration auf. Die zahlreichen Blastomerenabschnürungen und Fragmentationen von Zellbestandteilen waren durchweg gering oder gar nicht enzymatisch aktiv. Wenige stärkere Enzymaktivitäten waren innerhalb dieser unbefruchteten, degenerativ veränderten Eizellen anatomischen Strukturen nicht eindeutig zuzuordnen.

3.4.1. c) Dritte Zeitstufe (92 Std. nach HCG)

Die enzymatische Aktivität der aus dem Uterus isolierten 8-12-Zeller und Morulae war schwach bis mittelstark. Sie entsprach weitgehend der Aktivität vergleichbarer um 30 Stunden jüngerer Entwicklungsstadien (vgl. 2. Zeitstufe). Auch bei der Verteilung der enzymatischen Reaktion zeigten sich keine Unterschiede. An den Morulae fiel bisweilen auf, daß das Zentrum der Embryonen dunkler angefärbt war als die Peripherie (Abb. 20 B).
Auch die Blastocysten zeigten vorwiegend eine diffuse mittelstarke Reaktion (Abb. 14 B; 15 F; 21 C). Bei einer Blastocyste fehlte enzymatische Aktivität völlig. Einige Blastocysten fielen durch eine scharf begrenzte deutlich stärkere Reaktion im Bereich des Embryoblasten auf (Abb. 15 F). Zwei andere wiesen mehrere stärker reaktive Zentren geringer Größe auf, die über Embryo- und Trophoblast verteilt waren (Abb. 21 A,B). Die degenerativen Embryonen 92 Stunden nach HCG waren wiederum schwach reaktiv. Einige Degenerative waren völlig frei von Reaktionsprodukt. Wie schon bei früheren Stadien beobachtet, zeigten einige abnorm abgeschnürte Blastomeren degenerativer Embryonen eine starke enzymatische Aktivität.

3.4.2 Parthenogenese

3.4.2. a) Erste Zeitstufe

Parthenogenetische Pronuclei sind deutlich sPase-aktiv, geringe Enzymaktivitäten waren nicht zu beobachten. Ebenso wie in der normalen Embryogenese war auch hier die enzymatische Reaktion granulär und diffus im Zytoplasma verteilt (Abb. 16 A; 17 F,G,H). Zwischen diesen kontrastreichen Reaktionsprodukten waren Zellkerne nicht deutlich abzugrenzen. Die Polarkörper sowie die nur noch selten vorhandenen Follikelzellen waren vergleichsweise weniger

oder gar nicht kontrastiert (Abb. 16 A; 17 F,G,H). Ein parthenogenetischer Embryo der ersten Zeitstufe, bei dem die Teilung in zwei Blastomeren schon begonnen hatte, war nach dem Enzymnachweis zentral weniger, zu den Polen hin jedoch stärker gefärbt. Nach Abschluß der Zellteilung (Zweizellstadium) waren im Zytoplasma sowohl Bereiche stärkerer als auch schwächerer Reaktionsintensität vorhanden (Abb. 18 D). Mehrere eng beieinanderliegende dunkle Granula erinnern stark an Zellkernfragmente.
Unter den Parthenogenonen der ersten Zeitstufe fanden sich auch morphologisch auffällige Embryonen mit abnormer Blastomerenabschnürung. Diese waren nur schwach enzymatisch aktiv und wiesen in einigen Fällen Differenzen zwischen einzelnen Blastomeren auf (Abb. 22 D).

3.4.2. b) Zweite Zeitstufe

70 Stunden nach Elektrostimulation (entsprechend 90 Stunden nach HCG) waren noch viele parthenogenetische Pronuclei anzutreffen. Neben einigen Pronuclei, die noch starke Enzymaktivität aufwiesen, waren andere weniger enzymatisch aktive Zellen zu beobachten.
Parthenogenetische Zwei- und Dreizeller zeigten ebenso wie die entsprechenden Embryonen aus der normalen Embryogenese mittelstarke enzymatische Aktivität (Abb. 19 D,E). Entsprechende Enzymaktivitäten wiesen auch alle weiter entwickelten Parthenogenonen einschließlich früher Morulae auf (Abb. 16 C,D; 19 F; 20 D). Die schon in der normalen Embryogenese beobachteten geringen enzymatischen Aktivitätsunterschiede einzelner Blastomeren fanden sich auch bei entsprechenden parthenogenetischen Stadien (Abb.16 C,D; 19 F). Allerdings waren diese Aktivitätsunterschiede etwas häufiger und deutlicher zu beobachten. Kerne, die bei normal gezeugten Mehrzellern immer deutlich abzugrenzen waren, ho-

ben sich bisweilen nur wenig kontrastreich vom Zytoplasma ab (Abb. 19 D).

Embryonen, deren morphologische Entwicklung nicht regelrecht verlaufen war, wiesen unterschiedlichste enzymatische Aktivitäten auf. Neben einer schwachen oder fehlenden enzymatischen Reaktion waren auch Teile von Embryonen stark sPase-aktiv (Abb. 22 E,F,G).

3.4.2. c) Dritte Zeitstufe

In der dritten Serie parthenogenetischer Embryonen (112 Stunden nach HCG) konnten nur noch wenige morphologisch normale Embryonen gewonnen werden. Neben Blastocyste und Morula waren sogar noch Zwei- und Vierzeller anzutreffen. Diese frühen Stadien zeigten nahezu keine Enzymaktivität.
Normal gezeugte Blastocysten wiesen stets eine strenge morphologische Differenzierung in Embryo- und Trophoblast auf. Grobmorphologisch intakte parthenogenetische Blastocysten zeigen hingegen in Details oft Differenzierungsfehler (Abb. 16 F; 21 E, F). Im Gegensatz zur normalen Embryogenese weist der Trophoblast der untersuchten Parthenogenone Bereiche auf, in denen kein zytochemischer Enzymnachweis möglich war. Dabei handelt es sich offensichtlich um Zellen oder Zellgruppen, bei denen nur geringe oder keine sPase-Aktivität vorliegt (Abb. 16 F; 21 D,F).

Ebenso wie in den vorangegangenen bereits untersuchten Zeitstufen der parthenogenetischen Entwicklung war bei den degenerativen Embryonen kein einheitliches Aktivitätsmuster festzustellen. Es fanden sich neben Blastomerenabschnürungen mit relativ hoher Enzymaktivität auch solche, die keine sPase-Aktivität aufwiesen (Abb. 22 H).

3.5. Untersuchungen zur Endozytose (Meerrettichperoxidase)

3.5.1. Lichtmikroskopische Untersuchungen

Der zytochemische Nachweis der MPO ermöglichte eine eindeutige zytologische Darstellung der Endozytose dieser Substanz. Normale Blastocysten hatten schon nach zweistündiger Verfütterung soviel MPO endozytiert, daß der gesamte Trophoblast eine nahezu einheitlich dunkle Färbung aufwies (Abb. 23 A). Soweit bei der starken MPO-Anreicherung erkennbar, war das Enzym von den Zellen des Trophoblasten gleichmäßig aufgenommen worden. Selten waren einzelne geringer kontrastiert (Abb. 23 B, Pfeile). Auch nach vierstündiger Verfütterung der MPO fand sich ein entsprechendes Bild (Abb. 23 B).

Parthenogenetische Blastocysten zeigen nach zweistündiger Verfütterung von MPO eine weitaus schwächere Kontrastierung (Abb. 23 C). Auch nach 4 Stunden war nur vergleichsweise wenig MPO von den Trophoblastzellen aufgenommen worden (Abb. 32 D). Insbesondere fiel eine ungleichmäßige Verteilung der MPO auf, die in einigen Zellen nur in sehr geringen Mengen nachweisbar war (Abb. 23 C,D).

3.5.2 Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Endozytose

Auch die elektronenoptische Analyse trophoblastischer Zellen nach Verfütterung von Meerrettichperoxidase bestätigte die lichtmikroskopischen Befunde. Während in Lysosomen normaler trophoblastischer Zellen regelmäßig MPO nachweisbar war, fanden sich in zahlreichen trophoblastischen Lysosomen parthenogenetischer Embryonen keine Hinweise für phagozytierte MPO (Abb. 24 A,B). Auch das Grundzytoplasma der be

treffenden Trophoblastbereiche war stark aufgelockert und wies Rupturen auf. Für die Spezifität des zytochemischen Nachweises endozytierter MPO spricht, daß elektronenmikroskopisch im Zytoplasma und an zytoplasmatischen Strukturen keine Farbreaktionen zu finden waren.

4. DISKUSSION

Auch Säugetiere sind neben der normalen Embryonalentwicklung eingeschränkt zur Parthenogenese fähig. Als Sonderformen der normalen und parthenogenetischen Entwicklung werden gutartige Teratome und bösartige Teratome (Teratocarcinome) des Hodens und des Ovars aufgefaßt.
So ähneln sowohl spontan entstandene als auch experimentell erzeugte Teratomstammzellen frühen Embryonalzellen morphologisch (PIERCE et al 1967; DAMJANOV et al 1975; MARTIN et al 1977), biochemisch (BERNSTINE & EPHRUSSI 1975; DEWEY et al 1978; MARTIN et al 1978)und in ihrer Antigenstruktur (DEWEY et al 1977; JACOB 1977; STERN et al 1978). Zudem zeigen Teratocarcinomstammzellen ebenso wie Zellen parthenogenetischer Embryonen eine Tendenz zu unorganisiertem Wachstum (ILES et al 1975; STEVENS 1975; DAMJANOV et al 1975; KAUFMAN et al 1977). Entwickeln sich diese Zellen mit normalen Embryonalstadien (Chimärenexperimente), so sind sie in der Lage, in verschiedenen Organen regelrecht zu differenzieren: Pluripotenz (BRINSTER 1975; MINTZ & ILLMENSEE 1975; ILLMENSEE & MINTZ 1976; ILLMENSEE 1978; STEVENS et al 1977; SURANI et al 1977; STEVENS 1978). Diese Beobachtungen werden durch Transplantationsexperimente ergänzt. Werden frühe Mäuseembryonalstadien in die Hoden oder Nieren von adulten Mäusen transplantiert, entstehen häufig Teratocarcinome (STEVENS 1968, 1970 ; SOLTER et al 1970). Für eine spontane parthenogenetische Entwicklung von Ovarialteratomen aus Eizellen innerhalb des Ovars sprechen Untersuchungen von STEVENS & VARNUM (1974) und STEVENS (1975). Nicht nur für Laborsäuger sondern auch für den Menschen konnte der Nachweis einer parthenogenetischen Entstehung von Ovarialteratomen erbracht werden (LINDER 1969; LINDER & POWER 1970; LINDER et al 1975).

Durch diese offensichtlichen Zusammenhänge zwischen Parthenogenese und Teratomentwicklung ist die Frage nach der Entstehung sowie der Entwicklung parthenogenetischer Zellen bedeutsam. Eine der auffallendsten Unterschiede zur normalen Embryonalentwicklung ist das frühe Absterben parthenogenetischer Embryonen vor oder kurz nach der Implantation (TARKOWSKI et al 1970; GRAHEM 1974; STEVENS 1975). Ursache für diese Fehlentwicklung soll die Expression rezessiv lethaler Gene sein (GRAHAM 1971). Abgesehen davon, daß fast alle Untersuchungen an hochgradig ingezüchteten Mäusestämmen vorgenommen wurden, sprechen auch direkte experimentelle Befunde gegen diese Annahme. So fanden HOPPE & ILLMENSEE (1977) nach mikrochirurgischer Entfernung des männlichen Vorkerns befruchteter Eizellen und anschließender Diploidisierung eine normale Embryonalentwicklung ohne das paternale Genom. Offensichtlich ist der Befruchtungsvorgang für eine regelrechte embryonale Zellfunktion von Bedeutung.
Während der normalen Embryonalentwicklung auftretende enzymatische Aktivitätsmuster können u.a. durch spezifische Aktivitäten des embryonalen Genoms bedingt sein (SHERMAN 1979). Da parthenogenetisch erzeugte Embryonen (Parthenogenone) z.B. eine fehlerhafte Aktivierung ribosomaler Gene (HANSMANN et al 1978) sowie abnorme Proteinmuster (PETZOLDT & HOPPE 1980) zeigen, sind bei diesen auch normabweichende Enzymaktivitäten denkbar. Enzymdarstellungen während der Entwicklung parthenogenetischer Embryonen wurden bisher nicht veröffentlicht, sind aber nicht zuletzt auch wegen der Zusammenhänge zwischen Parthenogenese und Teratomentstehung von Bedeutung.

Zum Nachweis intrazellulärer Enzymaktivitäten wurden in der vorliegenden Untersuchung enzymzytochemische

Verfahren angewendet. Diese bieten gegenüber biochemischen Bestimmungsmethoden den Vorteil, zelluläre enzymatische Aktivitäten speziell innerhalb des Embryos ortsgenau bestimmen zu können. Zudem erlauben nur zytochemische Verfahren die gleichzeitige Beurteilung von Morphologie und Enzymaktivität. Dies ist für Untersuchungen während der parthenogenetischen Entwicklung umso wichtiger, als Parthenogenone oft eine normabweichende Morphologie aufweisen. Genaue Angaben über Enzymaktivitäten sind hingegen bei enzymzytochemischen Verfahren nur mit Einschränkungen möglich.
Zahlreiche Enzyme sind heute zytochemisch nachweisbar, so daß für die vorliegende Arbeit eine Auswahl getroffen werden mußte. Aus den folgenden Gründen entschied ich mich für die Darstellung Mg^{2+}-abhängiger ATPasen und der sauren Phosphatase:
Die membranständige Mg^{2+}-abhängige ATPase wird als enzymatischer Marker der Plasmamembran angesehen (DE PIERRE & KARNOVSKY 1973), und die Aktivität dieses Enzyms gibt Hinweise auf Funktionsabläufe im Plasmalemm. Wenngleich die Funktion dieses Enzyms noch nicht genau bestimmt werden konnte, hat es offensichtlich Bedeutung für Membranfusion und Membrandurchlässigkeit (HARDONK & KOUDSTAAL 1976). Die membranständige Mg^{2+}-ATPase wurde bereits von VORBRODT et al (1977) an Mäuseembryonen untersucht. Die mitochondriale Mg^{2+}-abhängige ATPase ist mit energieliefernden Prozessen der Zelle verknüpft (KIELLEY 1961; SCHATZ 1967). Die saure Phosphatase hingegen gilt als ein Markerenzym der Lysosomen, ist eng mit intrazellulärer Verdauung und Autolyse verbunden (DE DUVE 1963; BARRETT 1972) und wurde in der normalen Embryogenese bereits von mehreren Untersuchern dargestellt (MULNARD 1965; SOLTER et al 1973; VORBRODT et al 1976; ISHIYAMA & IZQUIERDO 1977). Da parthenogenetische Embryonen gehäuft degenerative Veränderungen zeigen (WITKOWSKA 1973 a; GRAHAM 1974) wurde die sPase

als weiteres Enzym in die Untersuchungen einbezogen. Alle ausgewählten Enzyme sind zudem an anderen Geweben bezüglich ihrer Spezifität auch mit Hilfe der Elektronenmikroskopie intensiv erforscht und die Nachweisverfahren entsprechend verfeinert worden (GOLDFISCHER et al 1963; SCHULZE & WOLLENBERGER 1965; WEISSENFELS 1967; HÜNDGEN 1968 a, b, 1977; ERNST & PHILPOTT 1970; JACOBSEN & JORGENSEN 1969).
Um einen spezifischen Enzymnachweis zu ermöglichen, muß schon die Art der Abtötung von Versuchstieren zur Gewinnung von Embryonen beachtet werden. So kann z.B. Äther Enzymaktivitäten verändern (AL AZZAWI & STOWARD 1973). In den eigenen Versuchen wurden deshalb die Tiere durch Genickbruch getötet. Zytochemische Untersuchungen können an ganzen Embryonen oder an Schnitten erfolgen. Speziell Semidünnschnitte ermöglichen eine genaue intrazelluläre Enzymbewertung. Diese Technik erfordert aber sehr aufwendige und zeitraubende Schnittserien, was im Rahmen meiner Untersuchung in der Durchführung zu aufwendig gewesen wäre. Auf eine Entfernung der Zona pellucida wurde verzichtet, da eine Membranschädigung nach Pronasebehandlung nicht ausgeschlossen werden kann (MINTZ 1962; SOLTER & SCHACHNER 1976). Versuche an lebenden Embryonen zeigen, daß eine Stoffaufnahme durch die Zona pellucida möglich ist (BRINSTER & THOMSON 1966; BIGGERS et al 1967). Auch die Ergebnisse der Enzymdarstellungen an aldehydfixierten Embryonen belegen, daß die Zona pellucida das Eindringen der verwendeten Chemikalien in den Embryo nicht verhindert.
Eine Fixierung von Zellstrukturen ist zum zytochemischen Enzymnachweis notwendig. Dabei muß ein Kompromiß zwischen Strukturerhaltung und Enzymschonung angestrebt werden (HÜNDGEN 1968 a; GEYER 1972). Die Spezifität der Enzymdarstellung und die Menge des enzymati-

schen Reaktionsproduktes wird hauptsächlich durch die Methodik der Inkubation beeinflußt (PEARSE 1968, 1972). Die in der Literatur angewendeten Verfahren der Fixierung und Inkubation von Embryonen zur Enzymdarstellung weisen zum Teil erhebliche Unterschiede auf. In der eigenen Arbeit wurde in der Methodik der Enzymdarstellung auf eine möglichst große Enzymschonung und lagegetreue Darstellung der Enzymaktivität besonderer Wert gelegt.

Diesem Ziel diente die Verwendung isotonischer und gepufferter Lösungen nicht nur bei der Inkubation, sondern auch bei der Fixierung und Wässerung (WEISSENFELS 1967; AHRENS & WEISSENFELS 1969). Die Art und die eingesetzte Konzentration des Fixativs wurde nach den Untersuchungen von HÜNDGEN (1968 a) ausgewählt und in Vorversuchen an Embryonen überprüft. Der Enzymschonung diente auch die Ausführung der Fixierung bei 4° C (GEYER 1972). Durch Verwendung besonders reinen Formaldehyds (aus Paraformaldehyd frisch zubereitet) wurde neben einer guten Strukturerhaltung eine weitgehende Enzymschonung erreicht (AHRENS & WEISSENFELS 1969; ERNST & PHILPOTT 1970).

Von grundsätzlicher Bedeutung für spezifische Enzymnachweise ist vor allem die optimale Zusammensetzung und chemische Stabilität der Inkubationsgemische (GEYER 1972). Um für die labilen bleinitrathaltigen Inkubationslösungen auch über eine Dauer von 3 Stunden eine gleichbleibende Konzentration zu erreichen, wurden die Versuche unter Paraffinöl vorgenommen. Dieses Öl ist chemisch inert und verhindert eine Verdunstung der Inkubationslösung, aber auch der Fixierungs- und Wässerungslösung.

Die in der Literatur beschriebene Enzymhemmung durch Bleiionen (MOSES et al 1966; JACOBSEN & JORGENSEN 1969) ist in der vorliegenden Arbeit weniger von Be-

deutung. Die verwendete Bleikonzentration von 3,5 mmol/l induziert nur eine geringe Enzymhemmung (JACOBSEN & JORGENSEN 1969),was sich auch in der deutlich nachweisbaren Enzymaktivität nach nur kurzer Inkubation zeigt. Bei allen zytochemischen Verfahren bereitet die Untersuchung zwischen den durch die enzymatische Aktivität bedingten Färbereaktionen und unspezifischen Kontrastierungen Schwierigkeiten. Unspezifische Reaktionen können z.B. durch endogene, nicht substratspezifische Phosphatasen, Spontanhydrolyse des Substrats (durch Bleiionen katalysiert) oder Anlagerung von Blei an zelluläre Strukturen hervorgerufen werden (GEYER 1972). Kontrollversuche sind deshalb zur Bestimmung der spezifischen enzymatischen Aktivität erforderlich (PEARSE 1968).

Kontrollversuche zur Spezifität des Nachweises der Mg^{2+}-abhängigen ATPasen wurden mit Inkubationsmedien ohne Magnesium bzw. ohne ATP deshalb an Pronuclei der normalen Embryogenese durchgeführt, weil diese Zellen eine sehr deutliche ATPase-Reaktion zeigen. Wenn Magnesium im Inkubationsmedium fehlt, sind trotz normaler ATP-Konzentrationen auch nach Verdoppelung der Inkubationszeit nur geringfügige Bleisulfidpräzipitate an den Pronuclei erkennbar. Gelegentlich auftretende Kontrastierungen im Bereich des perivitellinen Raums oder in Abschnitten der Zellperipherie können durch nichtenzymatische Hydrolyse von ATP, unspezifische Phosphatasen oder eine Mg^{2+}-unabhängige Na^{+}-K^{+}-ATPase verursacht sein (ROSENTHAL et al 1966; GEYER 1972; POWERS & TUPPER 1975). Diese unspezifischen Reaktionen sind jedoch im Vergleich mit der Gesamtaktivität so geringfügig, daß sie für die Bewertung vernachlässigt werden können.
Zusätzlich zeigen die Kontrollversuche ohne ATP im

Inkubationsmedium, daß unter den gewählten Versuchsbedingungen keine Anlagerung von Bleiionen an intra- oder extrazelluläre Strukturen infolge Bleiaffinität möglich ist.

Diese Spezifitätsuntersuchungen dienen als Grundlage für die Beurteilung der embryonalen ATPase-Aktivität. Die Mg^{2+}-abhängigen ATPasen sind in der frühen normalen Embryogenese vom Pronucleus bis zum 16-Zeller enzymatisch hochaktiv. Das enzymatische Reaktionsprodukt in diesen Stadien ist vor allem in der Zellperipherie, bisweilen auch extrazellulär lokalisiert. Diese Lokalisation des enzymatischen Reaktionsproduktes in Mäuseembryonen spricht bei Wertung von Literaturdaten (GOLDFISCHER et al 1963; WOLLENBERGER & SCHULZE 1966; ERNST & PHILPOTT 1970) dafür, daß es sich um den Nachweis der membranständigen Mg^{2+}-abhängigen ATPase handelt. Untersuchungen an Zellen verschiedener adulter Organismen zeigen, daß in der Zellmembran und in den Mitochondrien gleichzeitig eine Mg^{2+}-abhängige ATPase darstellbar ist (SCHULZE & WOLLENBERGER 1965; ESSNER et al 1965; WOLLENBERGER & SCHULZE 1966; AHRENS & WEISSENFELS 1969; ERNST & PHILPOTT 1970). Angesichts der hohen membranständigen ATPase-Aktivität der Mäuseembryonen muß gefragt werden, ob überhaupt genügend ATP in das Zytoplasma gelangen kann, um den Nachweis des mitochondrialen Enzyms zu ermöglichen. Wenn jedoch eine nachweisbare mitochondriale ATPase-Aktivität vorhanden ist, erschweren die dichten Präzipitate in der Zellperipherie eine eindeutige Beurteilung dieser mitochondrialen Enzymaktivität.
Auch VORBRODT et al (1977) wiesen elektronenmikroskopisch in allen präimplantativen Stadien der Mäuseembryogenese eine membranständige Mg^{2+}-abhängige ATPase nach. Über eine mitochondriale ATPase-Aktivität wurde

in dieser Arbeit nicht berichtet. Eine Nachweisbarkeit dieses mitochondrialen Enzyms ist allerdings bei der in dieser Untersuchung verwendeten Glutaraldehydfixierung stark erschwert (ESSNER et al 1965; HÜNDGEN 1968 a). Vermutlich wegen einer durch diese Fixierung bedingten Enzyminaktivierung war eine 20 bzw. 40-minütige Inkubation zum Nachweis der ATPase im Elektronenmikroskop notwendig. Elektronenoptisch stellte sich die enzymatische Aktivität als dünne,diskontinuierliche Schicht auf der Oberfläche von Eizellen und Pronuclei dar. In den eigenen Untersuchungen fallen die Oocyten und Einzellembryonen durch schalen- oder kappenartige Bereiche höchster Enzymaktivität in der Zellperipherie auf, die mit Bereichen schwächerer, diffuser Enzymaktivitäten abwechseln. Morphologische und biochemische Polaritäten der Eizelle könnte in Zusammenhang mit der ungleichmäßigen Verteilung der ATPase-Aktivität gesehen werden. So ist neben einer mosaikartigen Verteilung von Concavalin A-Rezeptoren (JOHNSON et al 1975; EAGER et al 1976) ein regional unterschiedlich dichter Mikrovillibesatz der Zellmembran von Oocyten nachgewiesen worden (NICOSIA et al 1977; VAN BLERKOM & MOTTA 1979). Es kann also angenommen werden, daß in den Bereichen mit zahlreichen Mikrovilli wegen der Vergrößerung der Zelloberfläche membranständige ATPase vermehrt vorkommt. Die eigenen Befunde an 8-16-Zell-Embryonen widersprechen allerdings dieser Annahme, da dort die höchste ATPase-Aktivität in den Bereichen der Blastomerenkontakte auftritt. Diese Kontaktbereiche weisen nach raster- und transmissionselektronenmikroskopischen Befunden nur spärlich Mikrovilli auf, während die apikalen Blastomerenmembranen dicht mit Mikrovilli besetzt sind (CALARCO & EPSTEIN 1973; CALARCO 1975; DUCIBELLA 1977; DUCIBELLA et al 1977; VAN BLERKOM & MOTTA 1979).

Mittels morphologischer und immunulogischer Methoden sind schon in 4-Zell-Embryonen Polaritäten festzustellen, die für die weitere Keimesdifferenzierung von Bedeutung sind (CALARCO & EPSTEIN 1973; VAN BLERKOM & MOTTA 1979; HANDYSIDE 1980; REEVE & ZIOMEK 1981; JOHNSON 1981). Deutliche Polaritäten zwischen Zentrum und Peripherie sind auch mit enzymzytochemischen Verfahren nachgewiesen worden (MULNARD & HUYGENS 1978; IZQUIERDO et al 1980; JOHNSON 1981; IZQUIERDO & EBENSPERGER 1982). So weisen die alkalische Phosphatase und die 5'-Nucleotidase ab dem Vierzellstadium Enzymaktivität nur im Bereich der Blastomerenkontakte auf. Auch die Mg^{2+}-abhängige ATPase weist polare Aktivitäten im Bereich der Blastomerenkontakte auf, wobei diese Verteilung der Enzymaktivität schon in Zweizellembryonen nachweisbar ist. Möglicherweise ist schon die ungleiche Verteilung der ATPase-Aktivität bei Oocyten in diesem Zusammehang zu sehen. JOHNSON (1981) nimmt infolge solcher polaren ATPase-Aktivitäten sogar die Entstehung intrazellulärer Gradienten an. Polare Unterschiede in der Zusammensetzung des Zytoplasmas werden auch in Zusammenhang mit der Differenzierung in Embryoblast (ICM) und Trophoblast gesehen (ZIOMEK & JOHNSON 1981; JOHNSON 1981; PRATT et al 1982).

Die Verteilung der ATPase-Aktivität in 2-, 4- und 8-Zellern läßt auch an eine Summation des enzymatischen Reaktionsproduktes im Bereich der Blastomerenkontakte denken. Da sich jedoch das dichtere Reaktionsprodukt auch in Bereiche außerhalb der eigentlichen Kontaktfläche erstreckt, kann diese Annahme verworfen werden.
Verglichen mit 2- bis 16-Zell-Embryonen nimmt die ATPase-Aktivität in späten Morulae und Blastocysten deutlich ab. Diese auffallende Veränderung der enzyma-

tischen Reaktionsstärke wurde auch von VORBRODT et al (1977) elektronenoptisch beobachtet. VORBRODT et al (1977) fanden hingegen keine höhere Aktivität der einander zugewandten Teile der Blastomerenmembran in den frühen Furchungsstadien. Dieser Befund muß meinen Ergebnissen nicht widersprechen, da VORBRODT et al (1977) neben einer Glutaraldehydfixierung und Ultradünnschnittechnik auch ein anderes Inkubationsmedium einsetzten. Auf diese Faktoren läßt sich wahrscheinlich auch zurückführen, daß VORBRODT et al (1977) am Embryoblasten und an der inneren Oberfläche der Trophoblastzellen nur geringe Enzymaktivitäten sahen, während in den eigenen Untersuchungen einige Blastocysten eine höhere enzymatische Aktivität des Embryoblasten aufweisen. Übereinstimmend mit VORBRODT et al (1977) kann auf der äußeren Oberfläche der Trophoblastzellen häufig eine höhere Aktivität der membranständigen ATPase nachgewiesen werden. Ob es sich bei der vergleichsweise stärkeren Enzymaktivität embryoblastischer Zellen auch um Darstellungen der Mg^{2+}-abhängigen mitochondrialen ATPase handelt, ist lichtmikroskopisch nicht zu entscheiden. Da die Untersuchungen von HANDYSIDE & JOHNSON (1978); HANDYSIDE (1980); ZIOMEK & JOHNSON (1981); JOHNSON & ZIOMEK (1981) gezeigt haben, daß aus den inneren Kontaktbereichen des frühen 8-16-Zell-Embryos der spätere Embryoblast hervorgeht, könnte auch die in diesen Embryonalbereichen beobachteten hohen ATPase-Aktivitäten in diesem Entwicklungszusammenhang gesehen werden.

Ebenso wie normale weisen auch parthenogenetische Embryonen ein charakteristisches Aktivitätsmuster der Mg^{2+}-abhängigen ATPasen auf. Das enzymatische Reaktionsprodukt ist bei diesen wiederum hauptsächlich in der Zellperipherie lokalisiert. Dies spricht wie in der normalen Embryogenese für ein Überwiegen der Aktivität

der membranständigen Mg^{2+}-abhängigen ATPase. Zusätzlich gleicht die Verteilung der Präzipitate weitgehend der normalen Embryogenese. So zeigen an parthenogenetische Pronuclei ebenso wie normal befruchtete eine typische, ungleichmäßige Verteilung stark ATPase-aktiver Membranbezirke. Die Zellen der Corona radiata haben sich bei den parthenogenetischen Pronuclei 42 Std. nach HCG meist bereits gelöst, was bei befruchteten 21 Std. nach HCG nur teilweise erfolgt ist. Unbefruchtete Eizellen sind lange von dichten Ringen von Corona-Zellen umgeben, die zudem eine hohe Mg^{2+}-ATPase-Aktivität zeigen. Lösen sich nach Aktivierung oder Alterung die Corona radiata-Zellen von der Oocyte, ist im Bereich der Corona die Mg^{2+}-abhängige ATPase weniger deutlich nachweisbar. Ob diese durch eine verringerte Aktivität der ATPasen zu erklären ist oder auf der starken Auflockerung des Coronabereichs beruht, kann nicht eindeutig beantwortet werden.

Vom parthenogenetischen Zweizell- bis zum Sechzehnzellstadium ist wiederum eine hohe Aktivität der membranständigen Mg^{2+}-abhängigen ATPase vorhanden, die enzymatische Reaktion tritt im Bereich der Blastomerenkontakte verstärkt auf. Aus diesen Befunden kann im Vergleich mit der normalen Embryogenese angenommen werden, daß auch parthenogenetische Furchungsstadien eine polare Organisation ihrer Blastomerenmembranen aufweisen. Ob die polare Entwicklung identisch mit der normalen Embryogenese verläuft, kann mit den eigenen Untersuchungen nicht völlig geklärt werden. Weitere Untersuchungen wären hierzu notwendig.

Bewertet man den perivitellinen Raum früher Embryonen, ergeben sich allerdings Aktivitätsunterschiede der Mg^{2+}-abhängigen ATPasen zwischen normalen Embryonen

und Parthenogenonen. Frühe parthenogenetische Embryonen fallen durch vermehrt extrazellulär lokalisiertes, unregelmäßiger verteiltes Reaktionsprodukt im Vergleich zu normalen Embryonen auf. Hierbei muß daran gedacht werden, daß bei parthenogenetischen Embryonen während früher Teilungsschritte Zytoplasmafragmente und kleine Vesikel ausgestoßen werden (TARKOWSKI et al 1970; WITKOWSKA 1973 a; SOLTER et al 1974).
Alle parthenogenetischen Stadien der dritten Zeitstufe (112 Std. nach HCG) sind deutlich geringer enzymatisch aktiv als jüngere Stadien. Unterschiede zur normalen Embryogenese finden sich in Blastocysten, da an den beobachteten parthenogenetischen Blastocysten keine stärkere enzymatische Aktivität des Embryoblasten gefunden werden kann. Die Bedeutung dieser Beobachtung sollte jedoch angesichts der versuchsbedingt geringen Zahl von Blastocysten vorsichtig bewertet werden. Die Verteilung der enzymatischen Aktivität am Trophoblasten ist hingegen weitgehend mit der normalen Embryonen identisch.
Abgesehen von den beschriebenen geringen Abweichungen der Verteilung der enzymatischen Aktivität zwischen normaler und parthenogenetischer Embryogenese fällt vor allem auf, daß in beiden Entwicklungsreihen Morulae und Blastocysten weitaus geringer Mg^{2+}-ATPase-aktiv sind als frühere Stadien.
Diese mit Beginn der Morula-Bildung auffallende Abnahme der ATPase-Aktivität findet zu einer Zeit statt, in der einschneidende morphologische und biochemische Veränderungen vor sich gehen. So formen sich in dieser Zeit die Zellmembranen des Embryos durch Ausbildung von Zellkontakten (gap junctions; tight junctions) um (DUCIBELLA et al 1975; DUCIBELLA & ANDERSON 1975; DUCIBELLA et al 1977; DUCIBELLA 1977) und der aktive Transport von Aminosäuren durch die Zellmembran nimmt

zu (SHERMAN 1979). In der gleichen Entwicklungsphase kommt es zu metabolischen Veränderungen (Übersicht in BIGGERS 1971; BIGGERS & STERN 1973; SHERMAN 1979). Die Sauerstoffaufnahme, für Oocyte, 2- und 4-Zeller gleich, steigt mit dem 8-Zell-Stadium leicht an und nimmt zum Morula- und Blastocysten-Stadium stark zu (MILLS & BRINSTER 1967). Ab dem 8-Zell-Stadium ist der Embryo erstmalig in der Lage, Glucose als Energiequelle zu verwenden (BRINSTER & THOMSON 1966). Die Aufnahme von Metaboliten des Zitronensäurezyklus verändert sich ebenfalls in diesem Zeitraum (STERN et al 1971; BIGGERS et al 1967; KRAMEN & BIGGERS 1971). Außerdem muß berücksichtigt werden, daß zum Zeitpunkt der Aktivitätsabnahme der ATPase die Embryonen vom Eileiter in den Uterus übertreten. Mögliche Einflüsse des äußeren Milieus auf die Aktivität der membranständigen ATPase sind aber bisher noch nicht näher untersucht worden. Für einen Einfluß des Alters normaler Embryonen oder des äußeren Milieus auf die Höhe der ATPase-Aktivität sprechen Beobachtungen an frühen Entwicklungsstadien (Pronucleus, 8-Zeller), die spät (92 Std. nach HCG) aus dem Uterus gewonnen wurden. Diese sind deutlich schwächer enzymatisch aktiv als entsprechende Stadien zu früheren Zeitpunkten. Andererseits läßt sich eine Stadienspezifität der Höhe der ATPase-Aktivität nachweisen. So zeigen Morulae und Blastocysten eine niedrigere enzymatische Aktivität als Embryonen früherer Stadien (z.B. Achtzeller), die zur gleichen Zeit aus dem Uterus gewonnen wurden. Eine stadienspezifische ATPase-Aktivität läßt sich auch bei parthenogenetischen Embryonen nachweisen. Diese weisen gegenüber normalen Embryonen einen Entwicklungsrückstand von bis zu einem Tag auf, was sowohl die eigenen Beobachtungen als auch die Untersuchungen von TARKOWSKI (1971); WITKOWSKA (1973a) und SOLTER et al

(1974) zeigen. Trotz dieser verzögerten Entwicklung ist die Stärke der ATPase-Aktivität den entsprechenden Stadien der normalen Embryogenese vergleichbar.

Vergleicht man aber relativ weit entwickelte Parthenogenone mit geringfügig zurückgebliebenen normalen Embryonen gleichen Alters (bezogen auf die HCG-Gabe), so findet man, daß parthenogenetische Embryonen länger eine hohe ATPase-Aktivität aufweisen als normale Embryonen. Dies wird deutlich bei der Gegenüberstellung von Achtzellstadien, die 90 Std. nach HCG als parthenogenetisch aktivierte Embryonen und solchen, die 92 Std. nach HCG als befruchtete Embryonen gewonnen wurden. Diese länger zu beobachtende ATPase-Aktivität kann als Besonderheit der parthenogenetischen Embryogenese gedeutet werden oder könnte durch den Zeitunterschied zwischen Befruchtungsreiz an der Oocyte und Elektrostimulation der Eizelle bedingt sein. Die Oocyten werden im Mittel 12 Std. nach HCG-Injektion befruchtet GATES (1971), während die Elektrostimulation 20 - 22 Std. nach HCG-Verabreichung vorgenommen wurde. Dies würde wiederum dafür sprechen, daß die Regulation der ATPase-Aktivität mit Entwicklungsprozessen in Zusammenhang steht, deren Beginn durch den Befruchtungs- oder Aktivierungsreiz bestimmt wird. So zeigen vergleichende Untersuchungen des Proteinmusters von unbefruchteten und befruchteten Eizellen eine deutliche Änderung des Proteinmusters im Anschluß an das Eindringen des Spermiums (LEVINSON et al 1978; HOWE & SOLTER 1979; CULLEN et al 1980). Ähnliche Veränderungen lassen auch Parthenogenone im Anschluß an die Aktivierung erkennen. Allerdings können bestimmte für unbefruchtete Eizellen typische Proteine in frühen parthenogenetischen Stadien länger nachgewiesen werden, während andere Proteine verspätet in für befruchtete Embryonen typischer Menge auftreten (PETZOLDT & HOPPE 1980). Schließ-

lich muß daran gedacht werden, daß zwischen Befruchtungsreiz (normale Embryogenese) und Aktivierungsreiz (Parthenogenese) nicht nur zeitliche sondern auch qualitative Unterschiede bestehen. Umso bemerkenswerter ist die doch weitgehende Übereinstimmung der Morphologie und der Regulation der ATPase-Aktivität bei normalen und parthenogenetischen Embryonen.

Verglichen mit den bisweilen extrem hohen Aktivitäten der Mg^{2+}-abhängigen ATPasen sind die sauren Phosphatasen präimplantativer Mäuseembryonen deutlich weniger aktiv. Um unspezifische Begleitreaktionen abzugrenzen wurden Kontrollversuche an Blastocysten durchgeführt, die in der präimplantativen Entwicklung eine besonders deutliche sPase-Reaktion zeigen. Hierzu wurde ohne Substrat (Na-ß-Glycerophosphat) inkubiert oder durch Zugabe von Natriumfluorid das Enzym gehemmt.
In den Kontrollversuchen waren die Blastocysten nicht kontrastiert, was für die Spezifität des verwendeten Enzymnachweises spricht. Extrem schwache Bleisulfidpräzipitate im Embryoblasten nach substratfreier Inkubation könnte durch enzymatische Spaltung intrazellulär vorhandener Phosphate oder durch Anlagerung von Bleiionen an zelluläre Strukturen bedingt sein. Diese Kontrastierungen im Embryoblasten sind jedoch so schwach, daß sie bei der Bewertung der Enzymaktivität in der frühen Embryogenese vernachlässigt werden können.

Im Vergleich zu diesen Kontrollen kann in allen untersuchten Stadien der normalen Embryogenese eine sPase-Aktivität nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den Mg^{2+}- abhängigen ATPasen ist die sPase-Aktivität feingranulär und gleichmäßig über das Zytoplasma verteilt. Geringfügig unterschiedliche Enzymreaktionen

zwischen einzelnen Blastomeren sind in seltenen Fällen zu beobachten. In Blastocysten ist der Embryoblast deutlicher kontrastiert; gelegentlich fallen im Embryoblasten und Trophoblasten Bereiche stärkerer Enzymaktivität auf.

Während für die Mg^{2+}-abhängigen ATPasen relativ wenige Vergleichsdaten aus der Literatur vorliegen, ist die sPase in präimplantativen Mäuseembryonen häufiger untersucht worden. Die eigenen Beobachtungen stimmen überein mit den Untersuchungen von ISHIYAMA & IZQIERDO (1977), die mit der Azofarbstoffmethode (BURSTONE 1962) in allen präimplantativen Mäuseembryonen eine sPase-Aktivität nachweisen. Eine nähere Beschreibung von Lokalisation und Intensität der Reaktion wurde in der betreffenden Arbeit nicht gegeben.
VORBRODT et al (1976) fanden in Mäuseembryonen elektronenoptisch mit der Bleisalzmethode (NOVIKOFF 1963) und der Azofarbstoffmethode (BARKA & ANDERSON 1962) vom Pronucleus bis zum Vierzeller eine sehr schwache Aktivität, die gegenüber den Kontrollversuchen kaum abzugrenzen war. Ab dem Achtzellstadium beschrieben die Autoren ein deutliches Ansteigen der sPase-Aktivität. Diese Enzymaktivität war in zytoplasmatischen Vakuolen lokalisiert, die sie als Lysosomen interpretierten. Allerdings beschreiben einige Autoren in älteren Arbeiten (CALARCO & BROWN 1969) zytoplasmatische Vesikel schon in Eizellen und 2-4-Zell-Stadien. Diese Vesikel können nach Größe und Aussehen als Lysosomen gedeutet werden. Die von mir lichtmikroskopisch beobachteten geringfügigen enzymatischen Aktivitätsunterschiede der sPase zwischen einzelnen Blastomeren könnte auch in Zusammenhang mit den Beobachtungen von VORBRODT et al (1976) gesehen werden, der in einzelnen Blastomeren eine unterschiedliche Zahl sPase-positiver Vakuolen beschrieb. Für eine Kontrastierung des Embryoblasten

fanden VORBRODT et al (1976) jedoch keine Hinweise. MULNARD (1965) und SOLTER et al (1973) wiesen mit ähnlichen zytochemischen Methoden lichtmikroskopisch eine ab dem Achtzellstadium beginnende, sich zur Blastocyste zunehmend verstärkende Aktivität der sPase nach. Die dunklere Färbung der inneren Zellmasse der Blastocysten führten SOLTER et al (1973) auf Farbsummationen der räumlich angeordneten enzymaktiven Zellen zurück. JOHNSON et al (1977) überprüften dies für den Nachweis der alkalischen Phosphatase an Schnittpräparaten von Blastocysten. Dabei zeigte sich, daß die intensivere Kontrastierung des Embryoblasten nicht auf enzymatische Summationseffekte zurückzuführen war.
Diese etwas unterschiedlichen Ergebnisse in den verschiedenen Veröffentlichungen sind vermutlich durch methodische Unterschiede bedingt. Bereits MULNARD (1965) räumte in einer Fußnote seiner Arbeit ein,daß eine zeitlich verkürzte, den enzymatischen Verhältnissen angepaßte Fixation auch in Eizellen und frühen Furchungsstadien den Nachweis der sPase ermöglichte.

Bei meinen Untersuchungen legte ich besonderen Wert auf eine kurzzeitige Fixierung mit einem geringkonzentrierten Fixativ und auf chemische Abstimmung und Stabilität des Inkubationsgemisches, die u.a. durch die Präparation unter Paraffinöl gewährleistet war. Auf die Bedeutung dieser Faktoren für den Nachweis der sauren Phosphatase wiesen auch WATERS & BUTCHER (1980) hin. Allerdings ist auffällig, daß trotz zum Teil unterschiedlicher methodischer Ansätze in der Literatur die grundlegenden Aussagen über die Aktivität der sPase in der frühen Mäuseembryogenese nahezu übereinstimmen.

DE DUVE & WATTIAUX (1966) vermuteten, daß "lysosomes undoubtedly carry out many of the ulterior degradative processes which accompany embryological development". Auch in der Mäuseembryogenese sind Lysosomen an der frühen Differenzierung beteiligt. So beobachteten SMITH & WILSON (1971) zahlreiche große sPase-reiche Vesikel in der ICM von implantierten Blastocysten. Sie führten dies auf eine spontane Degeneration und Heterophagozytose einzelner Blastomeren zurück, die auch bereits von POTTS (1969) an präimplantativen Blastocysten gefunden worden war. Die in den eigenen Untersuchungen beobachtete bereichsweise hohe sPase-Aktivität im Trophoblasten und Embryoblasten könnte somit nach den Beobachtungen von EL-SHERSHABY & HINCHCLIFFE (1974) an präimplantativen Blastocysten als Hinweis für eine Phagozytoseaktivität gesehen werden. Diese Autoren beschrieben das regelmäßige Auftreten von abgestorbenen Zellen auf der Oberfläche des Embryoblasten und von toten Zellen, die durch Zellen des Embryoblasten und möglicherweise auch des Trophoblasten phagozytiert werden. Auch VORBRODT et al (1976) interpretierten das Ansteigen der sPase-Aktivität in der Blastocyste mit solchen phagozytotischen Vorgängen.

Unter der Vielzahl normal entwickelter Embryonen treten in der frühen Embryogenese stets auch einige degenerative Embryonen auf. Diese morphologisch abnormen Stadien weisen zahlreiche Blastomerenabschnürungen auf und zeigen auch innerhalb des Embryos ein breites Spektrum von sehr starken bis nahezu fehlenden sPase-Aktivitäten. Die Beobachtungen von SLATER et al (1963); DIANZANI (1963) und KERR (1973) an Leberzellen belegen, daß lebensfähige Zellen am Rande von Nekrosen eine höhere Zahl von Lysosomen aufweisen als die wenig sPase-aktiven, nekrotischen Zellen selbst. Die unterschiedli-

che oder fehlende sPase-Aktivität in den von mir beobachteten morphologisch abnormen Embryonen könnte somit neben dem morphologischen Bild als Hinweis für eine partielle Degeneration von Zellen gewertet werden.

In der parthenogenetischen Entwicklung sind sehr viel mehr Embryonen während der frühen Entwicklungsstadien morphologisch abnorm als in der normalen Embryogenese (WITKOWSKA 1973 a; SOLTER et al 1974), was auch in der vorliegenden Untersuchung bestätigt werden konnte. Verteilung und Aktivität der sPase in morphologisch abnormen Parthenogenonen stimmt auffällig mit den Beobachtungen an degenerativen Stadien in der normalen Embryogenese überein. Alle morphologisch unauffälligen Parthenogenone zeigen ebenso wie entsprechende befruchtete Embryonen eine im Zytoplasma lokalisierte sPase-Aktivität. Lysosomen waren von SOLTER et al (1974) in frühen parthenogenetischen Stadien ultrastrukturell beobachtet worden und auch die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene sPase-Aktivität dürfte in der Hauptsache in diesen Organellen lokalisiert sein. Obwohl die enzymatische Gesamtaktivität parthenogenetischer und normaler Embryonen in etwa übereinstimmt, sind in parthenogenetischen Furchungsstadien Aktivitätsunterschiede zwischen einzelnen Blastomeren offensichtlich häufiger. Bei Parthenogenonen sind im Vergleich zu normalen Embryonen verminderte bzw. fehlende Aktivitäten ribosomaler Gene in einzelnen Blastomeren zu beobachten (HANSMANN et al 1978). Auffallend ist, daß auch sPase-aktive Parthenogenone in einzelnen Blastomeren nahezu keine Enzymaktivität aufweisen. Ein Zusammenhang zwischen diesen Befunden ist nicht sicher ausgeschlossen, da aktive Gene für eine regelrechte Protein-

synthese und somit auch für die Enzymneubildung notwendig sind.

In parthenogenetischen Blastocysten ist die sPase im Trophoblasten häufig bereichsweise nicht nachweisbar. Es finden sich auch nicht die an normalen Blastocysten häufig zu beobachtenden Zentren hoher sPase-Aktivität, die - wie oben angesprochen - als Zeichen der Heterophagozytose abgestorbener Zellen gewertet werden können. Degenerative und autolytische Veränderungen fanden VAN BLERKOM & RUNNER (1976) ultrastrukturell im Embryoblasten und Trophoblasten parthenogenetischer Blastocysten. Somit könnte bei Parthenogenonen der Abbau dieses nekrotischen Materials durch die benachbarten vitalen Zellen gestört sein. Um die Phagozytoseaktivität trophoblastischer Zellen färberisch darstellen zu können, wurde nach GRAHAM & KARNOVSKY (1966) Meerrettichperoxidase als partikuläre phagozytierbare Substanz verwendet. Die Phagozytose von MPO (Molekulargewicht 40000) wurde dadurch ermöglicht, daß die betreffenden Blastocysten vorher spontan aus der Zona pellucida geschlüpft waren. Der Nachweis der MPO in normalen Blastocysten zeigt, daß dieses Protein durch die Zellen des Trophoblasten gleichmäßig aufgenommen wird. Im Vergleich hierzu nahmen parthenogenetische Trophoblastzellen deutlich weniger und unregelmäßiger MPO auf, was sich elektronenmikroskopisch bestätigt. Trophoblastische Zellen parthenogenetischer Embryonen unterscheiden sich somit von denen normaler Blastocysten. Neben einer bereichsweise verringerten sPase ist die wahrscheinlich gestörte Phagozytose trophoblastischer Zellen besonders hervorzuheben. Diese intrazellulären Auffälligkeiten behindern parthenogenetische Blastocysten offensichtlich nicht beim aktiven Ausschlüpfen aus der Zona pellucida. Denkbar wäre jedoch, daß diese normabweichenden Trophoblastzel-

len eine Implantation parthenogenetischer Embryonen erschweren. Dafür spricht, daß um den Zeitpunkt der Implantation zahlreiche parthenogenetische Embryonen absterben (TARKOWSKI 1971). Zwar sind viele parthenogenetische Blastocysten in der Lage, eine deziduale Umwandlung der Uterusschleimhaut hervorzurufen, eine regelrechte Implantation konnte jedoch nur bei wenigen Embryonen nachgewiesen werden (WITKOWSKA 1973 b; KAUFMAN et al 1977). Da die weiteren Entwicklungsmöglichkeiten der in der vorliegenden Arbeit beobachteten Blastocysten nicht weiter untersucht werden konnten, läßt sich nicht endgültig entscheiden, ob die beobachteten Anomalien der Endozytose als Zeichen letaler Veränderungen angesehen werden können. Selbst wenn die untersuchten Blastocysten in ihrer Vitalität nicht unmittelbar vermindert sind, wäre eine Bedeutung einer gestörten Endozytose für die Überlebensfähigkeit parthenogenetisch aktivierter Embryonen denkbar. So könnte die gestörte Endozytose eine Verwertung abgestorbener Zellen, die bei parthenogenetischen wie bei normalen Embryonen regelmäßig vorkommen (VAN BLERKOM & RUNNER 1976; EL-SHERSHABY & HINCHCLIFFE 1974), unmöglich machen. Derartigen Heterophagozytosevorgängen wird eine Bedeutung für die Ernährung von Säugerzellen, die nicht direkt durch Blutversorgung mit Nährstoffen versorgt werden, zugeschrieben (HÜNDGEN 1975). Insbesondere für die präimplantative Phase der Embryonalentwicklung ist das Angebot an Nahrungs- und Baustoffen begrenzt (BIGGERS & STERN 1973). Es ist außerdem daran zu denken, daß nicht nur die Endozytose zellfremder Substanzen, sondern auch die Verdauung zelleigener Zytoplasmabestandteile bei parthenogenetischen Zellen gestört sein könnte. Intrazellulärer Autophagie wird eine wichtige Rolle für den physiologischen Umsatz der Zellorganellen

zugeschrieben (DE DUVE & WATTIAUX 1966; ERICSSON 1969; PITT 1975).

Bei der Bewertung der Befunde an normalen und parthenogenetischen Embryonen bleibt zu berücksichtigen,daß die Entwicklung durch zwei chemisch und physikalisch völlig verschiedene Stimuli angeregt wird. Unter diesem Gesichtspunkt sind die beobachteten weitgehenden Übereinstimmungen zellulärer Eigenschaften parthenogenetischer und normaler Embyonen umso bemerkenswerter. Offensichtlich setzen diese qualitativ unterschiedlichen Reize ähnliche Entwicklungsmechanismen in Gang. Zwar muß berücksichtigt werden, daß eine Anzahl von Parthenogenonen früh nach der Elektrostimulation degeneriert, weil der Aktivierungsprozeß einige Oocyten zu stark schädigt. Das Ausmaß der Schädigung variiert von Tier zu Tier, da infolge verschieden großer Ampullen und unterschiedlicher Entfernung der Elektroden auch Stromstöße unterschiedlicher Stärke appliziert werden. Eine Verbesserung der Ausbeute entwicklungsfähiger Parthenogenone bei Elektrostimulation ließe sich sicherlich durch technische Weiterentwicklung der Stromquelle mit elektronischer Begrenzung bzw. Regelung der Stromstärke erzielen. Der Aktivierungsprozeß hat jedoch auf den großen Teil der sich weiterentwickelnden Embryonen keinen deletären Effekt. Für die frühesten Stoffwechselleistungen ist bei diesen offensichtlich das maternale Genom ausreichend. Wie Chromosomenanalysen parthenogenetischer Embryonen gezeigt haben, haben dabei solche Embryonen Entwicklungsvorteile, die spontan diploidisieren oder Mosaike aus haploiden und diploiden Zellen aufweisen (WITKOWSKA 1973 a; KAUFMAN & GARDNER 1974; KAUFMAN & SACHS 1976; KAUFMAN 1978). Diese Untersuchungen lassen vermuten, daß bei den am weitesten entwickelten und

morphologisch normalen Parthenogenonen diploide Embryonen in einem höheren Prozentsatz vorkommen. Diese zeigen auf zellulärer Ebene, insbesondere hinsichtlich ihrer Enzymaktivität, erstaunliche Übereinstimmungen mit normalen Embryonen. Insbesondere im Hinblick auf die Entstehung von Teratomen unterstützt diese Beobachtung somit die These, daß das extrazelluläre Milieu die weitere Entwicklung parthenogenetischer Zellen beeinflussen könnte. Während parthenogenetisch aktivierte Zellen in Chimären mit befruchteten Blastocysten zur regelrechten Differenzierung fähig sind (STEVENS et al 1977; STEVENS 1978), wachsen sie innerhalb des Ovars unorganisiert und bilden ein Teratom. Welche Gegebenheiten der Umgebung die Entstehung von Teratomen begünstigen, ist letztlich noch unklar(DAMJANOV & SOLTER 1974 b). Neben chemischen, physikalischen (STEVENS & VARNUM 1974) und hormonalen (SOLTER et al 1975) wird immunologischen Mechanismen eine Rolle zugeschrieben (DAMJANOV & SOLTER 1974 a; SOLTER et al 1975).

Neben diesen extrazellulären Einflüssen behindern die vergleichsweise geringfügigen normabweichenden Enzym- und Endozytoseaktivitäten bei Parthenogenonen sicher eine regelrechte embryonale Entwicklung. Es muß aber gefragt werden, ob diese Anomalien Ausdruck gestörter Zellfunktionen sind, die nur bei den betreffenden Embryonen zur Degeneration führen. Dies könnte bedeuten, daß diese abnormen Embryonen die Ausnahme einer ansonsten relativ regelrecht verlaufenden präimplantativen Parthenogenese sind. Zumindest die morphologisch intakten parthenogenetischen Blastocysten sind jedoch so selektioniert, daß die dabei regelmäßig beobachteten intrazellulären

Veränderungen für Parthenogenone typisch sein dürften und eine regelrechte Differenzierung und Implantation dieser Zellen behindern.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Zur Parthenogenese sind auch Säugerembryonen in der frühen präimplantativen Phase ihrer Entwicklung fähig. Neben dem spontanen Auftreten parthenogenetischer Embryonen bei bestimmten Mäusestämmen lassen sich Parthenogenone ebenfalls experimentell erzeugen. Zytogenetische, zytologische und biochemische Untersuchungen der Parthenogenese sind nicht zuletzt für die Bewertung präimplantativer Entwicklungsvorgänge bei normal gezeugten Embryonen von Wert. Überdies sind experimentell erzeugte Parthenogenone wegen des gleichen Entstehungsmechanismus und morphologischer Gemeinsamkeiten auch als Modell für frühe Phasen der Teratomentstehung im Ovar geeignet.

Parthenogenetische Embryonen unterscheiden sich bisweilen morphologisch überraschend wenig von normal gezeugten Embryonen; eine normentsprechende präimplantative Entwicklung ist jedoch nicht die Regel. Auch die normale Differenzierung nach der Implantation ist bei Parthenogenonen gestört. Neben den bis her publizierten Erklärungsversuchen hierzu wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob Enzymaktivitätsveränderungen eine Ursache dieser parthenogenetischen Fehlentwicklungen sind. Lokalisation und Aktivität membranständiger Enzyme (Mg^{2+}-abhängige Adenosintriphosphatasen: ATPasen) sowie am intrazellulären Verdauungsablauf beteiligter Hydrolasen (saure Phosphatasen: sPasen) mußten zunächst in der normalen Embryogenese untersucht werden, um einen Vergleich mit parthenogenetischen Embryonen zu ermöglichen. Nur enzymzytochemische Methoden ermöglichten dabei die intrazelluläre Lokalisation und die Zuordnung der Enzymaktivitäten zu einzelnen Blastomeren.

Membranständige ATPasen zeigen bei experimentell erzeugten Parthenogenonen und bei normal befruchteten Embryonen eine weitaus höhere Aktivität als bei adulten Zellen. Die Verteilung des enzymatischen Reaktionsprodukts

stimmt in parthenogenetischen und normalen Embryonen weitgehend überein. Hohe lokale ATPase-Aktivitäten werden im Zusammenhang mit den Befunden über die polare Organisation der Blastomeren diskutiert. Unterschiede zwischen parthenogenetischer und normaler Embryogenese bestehen jedoch im Detail und im zeitlichen Ablauf der zum Morula-Stadium abnehmenden ATPase-Aktivität. Die SPasen sind vergleichsweise weniger aktiv, können aber in allen Stadien der normalen und parthenogenetischen Embryogenese nachgewiesen werden.

Während die Gesamtaktivität der sPasen in parthenogenetischen und normalen Embryonen in etwa übereinstimmt, sind in parthenogenetischen Furchungsstadien Aktivitätsunterschiede zwischen einzelnen Blastomeren häufiger. In parthenogenetischen Blastocysten ist die sPase im Trophoblasten bereichsweise nicht nachweisbar. Es finden sich auch nicht die an normalen Blastocysten beobachteten Zentren hoher sPase-Aktivität. Um zu überprüfen, ob bei diesen parthenogenetischen Trophoblastzellen eine gestörte Endozytosefunktion vorliegt, wurde diesen Parthenogenonen nach Schlüpfen aus der Zona pellucida Meerrettichperoxidase (MPO) verfüttert. Phagozytierte MPO wurde licht- und elektronenmikroskopisch nachgewiesen. Während Trophoblastzellen normaler Blastocysten die MPO gleichmäßig endozytieren, nehmen parthenogenetische Trophoblastzellen deutlich weniger und unregelmäßiger MPO auf.

Obwohl die Embryonalentwicklung bei parthenogenetischen und normalen Embryonen durch chemisch und physikalisch völlig unterschiedliche Stimuli angeregt wird, oft ein unterschiedliches Genom vorliegt und die Entwicklung bei Parthenogenonen zeitlich verzögert ist, ergeben sich für die Aktivität und intrazelluläre Verteilung der untersuchten Enzyme vom Pronucleus bis zur späten Morula sehr ähnliche Ergebnisse. Erst bei parthenogene-

tischen Blastocysten und den vergleichbaren Stadien der normalen Embryogenese werden Unterschiede im Enzymmuster und in der Endozytoseaktivität deutlich. Nicht nur für die Implantation sondern auch für die normale weitere Differenzierung der Embryonen sind jedoch regelrechte Zellfunktionen Voraussetzung.

Neben einer noch spekulativen grundlegenden Ursache können für die Fehlentwicklung von Parthenogenonen auch enzymzytochemische Besonderheiten bedeutsam sein. Ein exogener Einfluß auf diese intrazellulären Störungen kann jedoch nach Literaturdaten (Chimären-Transplantationsexperimente) nicht ausgeschlossen werden. Somit ist auch für die frühe Teratomentwicklung neben den intrazellulären Störungen infolge der parthenogenetischen Entwicklung auch ein exogener Einfluß bei der embryonalen Fehldifferenzierung anzunehmen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

AHRENS, R., WEISSENFELS, N. — Nachweis von Adenosintriphosphatase in den Mitochondrien kultivierter Hühnerherzmyoblasten. Histochemie 19, 248-254 (1969)

AL-AZZAWI,H.T., STOWARD,P.J. — The effects of lethal procedures on the histochemical localization of acid hydrolases. Histochemie 37, 187-195 (1973)

AUSTIN,C.R. — Cortical granules in hamster eggs. Exp. Cell Res. 10, 533-540 (1956)

BARKA, T. ANDERSON, P.J. — Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosanilin as coupler. J. Histochem. Cytochem. 10,741-753 (1962)

BARRETT, A.J. — Lysosomal Enzymes In: J.T. DINGLE (ed.), Lysosomes- a laboratory handbook, pp. 46-135, North Holland Publishing Co., Amsterdam and London (1972)

BERNSTINE, E.G. EPHRUSSI, B. — Alkaline phosphatase activity in embryonal carcinoma and its hybrids with neuroblastoma. In: M.I. SHERMAN and D. SOLTER (eds.), Teratomas and Differentiation, pp. 271-287, Academic Press, New York (1975)

BIGGERS, J.D. — Metabolism of mouse embryos. J. Reprod. Fertil. Suppl. 14, 41-54 (1971)

BIGGERS, J.D., STERN,S. — Metabolism of the preimplantation mammalian embryo. Adv. Reprod. Physiol. 6, 1-59 (1973)

BIGGERS, J.D., WHITTINGHAM, D.G., DONAHUE, R.P.
The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 58, 560-567 (1967)

BRADEN, A.W.H. AUSTIN, C.R.
Reactions of unfertilized mouse eggs to some experimental stimuli. Exp. Cell Res. 7, 277-280 (1954)

BRINSTER, R.L.
Can teratocarcinoma cells colonize the mouse embryo? In: M.I. SHERMAN and D. SOLTER (eds.), Teratomas and Differentiation, pp. 51-58, Academic Press, New York (1975)

BRINSTER, R.L., THOMSON, J.L.
Development of eight-cell mouse embryos in vitro. Exp. Cell Res. 42, 303-315 (1966)

BURSTONE, M.S.
Enzyme Histochemistry Academic Press, New York (1962)

CALARCO, P.G.
Cleavage (mouse) In: E.S.E. HAFEZ (ed.), Scanning Electron Microscopic Atlas of Mammalian Reproduction, Berlin, Springer Verlag (1975)

CALARCO, P.G., BROWN, E.H.
An ultrastructural and cytologic study of preimplantation development in the mouse. J. Exp. Zool. 171, 253-283 (1969)

CALARCO, P.G., EPSTEIN, C.
Cell surface changes during pre-implantation development in the mouse. Dev. Biol. 32, 208-213 (1973)

CHANG, M.C.
Cleavage of unfertilized ova in immature ferrets. Anat. Rec. 108, 31-42 (1950)

CHANG, M.C. Development of parthenogenetic rabbit blastocysts induced by low temperature storage of unfertilized ova. J. Exp. Zool. 125, 127-150 (1954)

CORFMAN, P.A., RICHART, R. M. Chromosome number and morphology of benign ovarian cystic teratomas. N. Engl. J. Med. 271, 1241-1244 (1964)

CULLEN, B., EMIGHOLZ, K., MONAHAN, J. The transient appearance of specific proteins in one-cell mouse embryos. Dev. Biol. 76, 125-221 (1980)

DAMJANOV, I., KATIC, V., STEVENS, L.C. Ultrastructure of ovarian teratomas in LT mice. Z. Krebsforsch. 83, 261-267 (1975)

DAMJANOV, I., SOLTER, D. Host-related factors determine the outgrowth of teratocarcinomas from mouse egg-cylinders. Z. Krebsforsch. 81, 63-69 (1974a)

DAMJANOV, I., SOLTER, D. Experimental teratoma. Curr. Top. Path. 59, 69-130 (1974b)

DE DUVE, C. Structure and functions of lysosomes. In: P. KARLSON (ed.), Funktionelle und morphologische Organisation der Zelle, Heidelberg, Springer Verlag (1963)

DE DUVE, C. WATTIAUX, R. Functions of lysosomes. Ann. Rev. Physiol. 28, 435-492 (1966)

DEMPSEY, E.W. Maturation and early cleavage figures in ovarian ova. Anat. Rec. 75, 223-235 (1939)

DENKER, H.W. Implantation Berlin, Springer Verlag (1977)

DE PIERRE, J.W., KARNOVSKY, M.L. Plasma membranes of mammalian cells. J. Cell Biol. 56, 275-303 (1973)

DEWEY, M.J., FILLER, R., MINTZ, B. Protein patterns of developmentally totipotent mouse teratocarcinoma cells and normal early embryo cells. Dev. Biol. 65, 171-182 (1978)

DEWEY, M.J., GEARHART, J.D., MINTZ, B. Cell surface antigens of totipotent mouse teratocarcinoma cells grown in vivo: Their relation to embryo, adult, and tumor antigens. Dev. Biol. 55, 359-374 (1977)

DIANZANI, M.U. Lysosome changes in liver injury. In: DE REUCK, A.V.S. and CAMERON, M.P. (eds.), Ciba Foundation Symposium Lysosomes, pp. 335-351, London, J.A. Churchill (1963)

DUCIBELLA, T. Surface changes in the developing trophoblast cell. In: JOHNSON, M.H. (ed.), Development in Mammals, Vol. 1, pp. 5-30, North Holland Publishing Co., Amsterdam and New York (1977)

DUCIBELLA, T., ALBERTINI, D.F., ANDERSON, A., BIGGERS, J.D. The preimplantation mammalian embryo: characterization of intercellular junctions and their appearance during development. Dev. Biol. 45, 231-250 (1975)

DUCIBELLA, T., ANDERSON, E. Cell shape and membrane changes in the eight cell mouse embryo: prerequisites for morphogenesis of the blastocyst. Dev. Biol. 47, 45-58 (1975)

DUCIBELLA, T., UKENA, T., KARNOVSKY, M., ANDERSON, E. Changes in cell surface and cytoplasmic organization during early embryogenesis in the preimlantation mouse embryo. J. Cell Biol. 74, 153-167 (1977)

EAGER, D.D., JOHNSON, M.H., THURLEY, K.W. Ultrastructural studies on the surface of the mouse egg. J. Cell Sci. 22, 345-353 (1976)

EL-SHERSHABY, A.M., HINCHCLIFFE; J.R. Cell redundancy in the zona-intact preimplantation mouse blastocyst: a light and electron microscope study of dead cells and their fate. J. Embryol. exp. Morph. 31, 643-654 (1974)

EPPIG, J.J., Granulosa cell deficient follicles. Occurence, structure, and relationship to ovarian teratocarcinogenesis in strain LT/Sv mice. Differentiation 12, 111-120 (1978)

ERICSSON, J.L.E. Mechanism of cellular autophagy. In: DINGLE, J.T. and FELL, H.B. (eds.), Lysosomes in Biology and Pathology, Vol. 2, pp. 346-349, North Holland Publishing Co., Amsterdam and London (1969)

ERNST, S.A., PHILPOTT, C.W. Preservation of Na-K-activated and Mg-activated adenosine triphosphatase activities of avian salt gland and teleost gill with formaldehyde as fixative. J. Histochem. Cytochem. 18, 251-263 (1970)

ESSNER, E., FOGH, J., FABRIZIO, P. — Localization of mitochondrial adenosine triphosphatase activity in cultured human cells. J. Histochem. Cytochem. 13, 647-656 (1965)

FULTON, B.P., WHITTINGHAM, D.G. — Activation of mammalian oocytes by intracellular injection of calcium. Nature 273, 149-151 (1978)

GALTON, M., BENIRSCHKE, K. — Forty-six chromosomes in an ovarian teratoma. Lancet 2, 761-762 (1959)

GATES, A.H. — Maximizing yield and developmental uniformity of eggs. In: DANIEL, J.C. (ed.), Methods in Mammalian embryology, pp.64-75, W.H. Freeman, San Francisco (1971)

GEYER, G. — Ultrahistochemie 2. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1972)

GOLDFISCHER, S., ESSNER, E., NOVIKOFF, A.B. — The localization of phosphatase activities at the level of ultrastructure. J. Histochem. Cytochem. 12, 72-95 (1964)

GOMORI, G. — The distribution of phosphatase in normal organs and tissues. J. Cell. Physiol. 17, 71-83 (1941a)

GOMORI, G. — Distribution of acid phospatase in the tissues under normal and under pathologic conditions. Arch. Path. 32, 189-199 (1941 b)

GRAHAM, C.F. Parthenogenetic mouse blastocysts Nature 226, 165-167 (1970)

GRAHAM, C.F. Experimental early parthenogenesis in mammals. Advances in the Biosciences 6, 87-97 (1971)

GRAHAM, C.F. The production of parthenogenetic mammalian embryos and their use in biological research. Biol. Rev. 49, 399-422 (1974)

GRAHAM, C.F., DEUSSEN, Z.A. In vitro activation of mouse eggs. J. Embryol. Exp. Morphol. 31, 497-512 (1974)

GRAHAM, R.C., KARNOVSKY, M.J. The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney; ultrastructural cytochemistry by a new technique. J Histochem. Cytochem. 14, 291-301 (1966)

HÄGGSTRÖM, P. Über parthenogenetische Teilungen von Eizellen in normalen Ovarien des Menschen. Acta Gynecol. Scand. 1, 137-145 (1922)

HANDYSIDE, A.H. Distribution of antibody- and lectin-binding sites on dissociated blastomeres from mouse morulae: evidence for polarization at compactation. J. Embryol. Exp. Morphol. 60, 99-116 (1980)

HANDYSIDE, A.H., JOHNSON, M.H.
Temporal and spatial pattern of the synthesis of tissue-specific polypeptides in the preimplantation mouse embry.
J. Embryol. Exp. Morphol. 44, 191-199 (1978)

HANSMANN, I., GEBAUER, J., GRIMM, T.
Impaired gene activity for 18S and 28S rRNA in early embryonic development of mouse parthenogenones.
Nature 272, 377-378 (1978)

HARDONK, M.J., KOUDSTAAL, J.
Enzyme histochemistry as a link between biochemistry and morphology.
Prog. Histochem. Cytochem. 8, 1-68 (1976)

HARMAN, M.T., KIRGRIS, H.D.
The development and atresia of the Graafian follicle and the division of intra-ovarian ova in the guinea pig.
Am. J. Anat. 63, 79-99 (1938)

HOPPE, P.C., ILLMENSEE, K.
Microsurgically produced homozygous diploid uniparental mice.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5657-5661 (1977)

HOWE, C.C., SOLTER, D.
Cytoplasmic and nuclear protein synthesis in preimplantation mouse embryos.
J. Embryol. Exp. Morphol. 52, 209-225 (1979)

HÜNDGEN, M.
Der Einfluß verschiedener Aldehyde auf die Strukturerhaltung gezüchteter Zellen und auf die Darstellbarkeit von vier Phosphatasen.
Histochemie 15, 46-61 (1968 a)

HÜNDGEN, M. Der Einfluß des pH-Wertes auf die Darstellbarkeit von vier Phosphatasen bei gezüchteten Hühnerherzmyoblasten. Histochemie 15, 62-67 (1968 b)

HÜNDGEN, M. Der intrazelluläre Verdauungsapparat kultivierter Hühnerherzzellen. Eine morphologische, enzymcytochemische und morphometrische Untersuchung. Zool. Jb. Anat. 94, 591-622 (1975)

HÜNDGEN, M. Potential and limitations of enzyme cytochemistry: studies of the intracellular digestive apparatus of cells in tissue culture. Int. Rev. Cytol. 48, 281-321 (1977)

HÜNDGEN, M., WEISSENFELS, N. Die Fixierung mit Aldehyden für morphologische und cytochemische Untersuchungen. Acta histochemica Suppl. 13, 85-89 (1973)

ILES, S.A., MC BURNEY, M.W., BRAMWELL, S.R., DEUSSEN, Z.A., GRAHAM, C.F. Development of parthenogenetic and fertilized mouse embryos in the uterus and in extra-uterine sites. J. Embryol. Exp. Morphol 34, 387-405 (1975)

ILLMENSEE, K. Reversion of malignancy and normalized differentiation of teratocarcinoma cells in chimeric mice. Basic Life Sci. 12, 3-25 (1978)

ILLMENSEE, K., MINTZ, B. Totipotency and normal differentiation of single teratocarcinoma cells cloned by injection into blastocysts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 549-553 (1976)

INOUE, M., WOLF, D.P. Comparative solubility properties of the zonae pellucidae of unfertilized and fertilized mouse ova. Biol. Reprod. 11, 558-565 (1975)

ISHIYAMA, V., IZQUIERDO, L. The onset of phosphatase activity in early mammalian embryos. J. Embryol. Exp. Morphol. 42, 305-308 (1977)

IZQUIERDO, L., LOPEZ, T., MARTICORENA, P. Cell membrane regions in preimplantation mouse embryos. J. Embryol. Exp. Morphol. 59, 89-102 (1980)

IZQUIERDO, L., EBENSPERGER, C. Cell membrane regionalization in early mouse embryos as demonstrated by 5'-nucleotidase activity. J. Embryol. Exp. Morphol. 69, 115-126 (1982)

JACOB, F. Mouse teratocarcinoma and embryonic antigens. Immunol. Rev. 33, 3-32 (1977)

JACOBSEN, N.O., JORGENSEN, P.L. A quantitative biochemical and histochemical study of the lead method for localization of adenosine triphosphate-hydrolizing enzymes. J. Histochem. Cytochem. 443-453 (1969)

JOHNSON, L.V., CALARCO, P.G., SIEBERT, M.L. Alkaline phosphatase activity in the preimplantation mouse embryo. J. Embryol. Exp. Morphol. 40, 83-89 (1977)

JOHNSON, M.H. The molecular and cellular basis of preimplantation mouse development. Biol. Rev. 56, 463-498 (1981)

JOHNSON, M.H., EAGER, D., MUGGLETON-HARRIS, A., GRAVE, H.M.
Mosaicism in organization of concavalin A receptors on surface membrane of mouse egg.
Nature 257, 321-322 (1975)

JOHNSON, M.H., ZIOMEK, C.A.
The foundation of two distinct cell lineages within the mouse morula.
Cell 24, 71-80 (1981)

KAUFMAN, M.H.
Parthenogenesis in the mouse.
Nature 242, 475-476 (1973)

KAUFMAN, M.H.
The experimental induction of parthenogenesis in the mouse.
In: BALLS, M. and WILD, A.E. (eds.), The Early Development of Mammals,pp.25-47 Cambridge University Press, London (1975)

KAUFMAN, M.H.
Chromosome analysis of early post-implantation presumptive haploid parthenogenetic mouse embryos.
J. Embryol. Exp. Morphol. 45, 85-91 (1978)

KAUFMAN, M.H., BARTON, S.C., SURANI, M.A.H.
Normal postimplantation development of mouse parthenogenetic embryos to the forelimb bud stage.
Nature 265, 53-55 (1977)

KAUFMAN, M.H., GARDNER, R.L.
Diploid and haploid mouse parthenogenetic development following in vitro activation.
J. Embryol. Exp. Morphol. 31, 635-642 (1974)

KAUFMAN, M.H., SACHS, L.
Complete preimplantation development in culture of parthenogenetic mouse embryos.
J. Embryol. Exp. Morphol. 35, 179-190 (1976)

KIELLEY, W.W. Acid anhydride hydrolysis. In: BOYER, P.D., LARDY, H. and MYRBÄCK, K. (eds.), The Enzymes, 2nd ed., Vol. 5, pp. 149-168, Academic Press, New York (1961)

KRAFKA, J. Parthenogenetic cleavage in the human ovary. Anat. Rec. 75, 19-21 (1939)

KRAMEN, M., BIGGERS, J.D. Uptake of tricarboxylic acid cycle intermediates by preimplantation mouse embryos in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 2556-2559 (1971)

LEVINSON, J., GOODFELLOW, P., VADEBONCOEUR, M., MC DEVITT, H. Identification of stage-specific polypeptides sythesized during murine preimplantation development. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 3332-3336 (1978)

LINDER, D. Gene-loss in human teratomas. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63, 699-704 (1969)

LINDER, D., MC CAW, B.K., HECHT, F. Parthenogenetic origin of benign ovarian teratomas. N. Engl. J. Med. 292, 63-66 (1975)

LINDER, D., POWER, J. Further evidence for post-meiotic origin of teratomas in the human female. Ann. Hum. Genet. 34, 21-30 (1970)

MARTIN, G.R., SMITH, S., EPSTEIN, C.J. Protein synthetic pattern in teratocarcinoma stem cells and mouse embryos at early stages of development. Dev. Biol. 66, 8-16 (1978)

MARTIN, G.R., WILEY, L.M., DAMJANOV, I. — The development of cystic embryoid bodies in vitro from clonal teratocarcinoma stem cells. Dev. Biol. 61, 230-244 (1977)

MILLS, R.M., BRINSTER, R.L. — Oxygen consumption of preimplantation mouse embryos. Exp. Cell Res. 47, 337-344 (1967)

MINTZ, B. — Experimental study of the developing mammalian egg: removal of the zona pellucida. Science 128, 594-595 (1962)

MINTZ, B., ILLMENSEE, K. — Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3585-3589 (1975)

MITTWOCH, U. — Parthenogenesis. J. Med. Genet. 15, 165-181 (1978)

MOSES, H.L., ROSENTHAL, A.S., BEAVER, D.L., SCHUFFMAN, S.S. — Lead ion and phosphatase histochemistry. II. Effect of adenosine triphosphate hydrolysis by lead ion on the histochemical localization of adenosine triphosphatase activity. J. Histochem. Cytochem. 14, 702-710 (1966)

MULNARD, J. — Studies of mouse ova in vitro. In: WOLSTENHOLME, G.E.W. and O'CONNOR,M. (eds.), Preimplantation Stages of Pregnancy, pp. 123-144, Little Brown, Boston (1965)

MULNARD, J., HUYGENS, R. — Ultrastructural localization of non-specific alkaline phosphatase during cleavage and blastocyst formation in the mouse. J. Embryol. Exp. Morphol. 44, 121-131 (1978)

NICOSIA, S.V., WOLF, D.P., INOUE, M. — Cortical granule distribution and cell surface characteristics in mouse eggs. Dev. Biol. 57, 56-74 (1977)

NOVIKOFF, A.B. — Lysosomes in the physiology and pathology of cells: contributions of staining methods. In: DE REUCK, A.V.S. and CAMERON, M.P. (eds.), Ciba Foundation Symposium Lysosomes, pp. 36-77, Little Brown, Boston (1963)

PEACOCK, A.D. — Some problems of parthenogenesis. Brit. Ass. Adv. Sci. 9, 134-148 (1952)

PEARSE, A.G.E. — Histochemistry, 3rd. ed. Churchill Livingstone, London (1968/1972)

PETZOLDT, U., HOPPE, P.C. — Spontaneous parthenogenesis in mus musculus. Comparison of protein synthesis in parthenogenetic and normal preimplantation embryos. Mol. Gen. Genet. 180, 547-552 (1980)

PIERCE, G.B., STEVENS, L.C., NAKANE, P.K. — Ultrastructural analysis of the early development of teratocarcinoma. J. Natl. Cancer Inst. 39, 755-753 (1967)

PINCUS, G. — The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. IV: The development of fertilized and artificially activated rabbit eggs. J. Exp. Zool. 82, 85-130 (1939 a)

PINCUS, G. — The breeding of some rabbits produced by recipients of artificially activated ova. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 25, 557-559 (1939 b)

PINCUS, G., ENZMANN, E.V. — The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. II. Activation of tubal eggs of the rabbit. J. Exp. Zool. 73, 195-208 (1936)

PINCUS, G., SHAPIRO, H. — Further studies on the parthenogenetic activation of rabbit eggs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 26, 163-165 (1940)

PITT, D. — Lysosomes and Cell Function. Longman Group, London and New York (1975)

POTTS, D.M. — The ultrastructure of egg implantation. In: MC LAREN, A. (ed.), Advances in Reproductive Physiology, vol. IV, chap. 7, Logos Press, London (1969)

POWERS, R.D., TUPPER, J.T. — Ion transport and permeability in the mouse egg. Exp. Cell Res. 91, 413-421 (1975)

PRATT, H.P.M., ZIOMEK, C.A., REEVE, W.J.D., JOHNSON, M.H. — Compactation of the mouse embryo: an analysis of its components. J. Embryol. Exp. Morphol. 70, 113-132 (1982)

REEVE, W.J.D., ZIOMEK, C.A. — Distribution of microvilli on dissociated blastomeres from mouse embryos: evidence for surface polarization at compactation. J. Embryol. Exp. Morphol. 62, 339-350 (1981)

ROSENTHAL, A.S., MOSES, H.L., BEAVER, D.L., SCHUFFMAN, S.S. — Lead ion and phosphatase histochemistry. I. Nonenzymatic hydrolysis of nucleoside phosphates by lead ion. J. Histochem. Cytochem. 14, 698-701 (1966)

SCHATZ, G. Oxidative Phosphorylierung in Mitochondrien. Angew. Chemie 79, 1088-1099 (1967)

SCHULZE, W., WOLLENBERGER, A. Elektronenmikroskopischer Nachweis mitochondrialer Adenosintriphosphatase-aktivität in tierischen Geweben. Histochemie 5, 417-429 (1965)

SHERMAN, M.I. Developmental biochemistry of preimplantation mammalian embryos. Annu. Rev. Biochem. 48, 443-470 (1979)

SIRACUSA, G., WHITTINGHAM, D.G., MOLINARO, M., VIVARELLI, E. Parthenogenetic activation of mouse oocytes induced by inhibitors of protein synthesis. J. Embryol. Exp. Morphol. 43, 157-166 (1978)

SLATER, T.F., GREENBAUM, A.L., WANG, D.Y. Lysosome changes during liver injury and mammary involution. In: DE REUCK, A.V.S. and CAMERON,M.P. (eds.), Ciba Foundation Symposium Lysosomes, pp. 311-334, J.A. Churchill, London (1963)

SLYE, M., HOLMES, H.F., WELLS, H.G. Primary spontaneous tumors of the ovary in mice. Studies on the incidence and inheritability of spontaneous tumors in mice. J. Cancer Res. 5, 205-226 (1920)

SMITH, M.S.R., WILSON, I.B. Histochemical observations on early implantation in the mouse. J. Embryol. Exp. Morphol. 25, 165-174 (1971)

SOLTER, D., ADAMS, N., DAMJANOV, I., KOPROWSKI, H. Control of teratocarcinogenesis. In: SHERMAN, M.I. and SOLTER, D. (eds.),Teratomas and Differentiation, pp. 139-160, Academic Press, New York (1975)

SOLTER, D., BICZYSKO, W., PIENKOWSKI, M., KOPROWSKI, H. Ultrastructure of early development of mouse parthenogenones. J. Exp. Zool. 188, 1-24 (1974)

SOLTER, D., DAMJANOV, I., SKREB, N. Distribution of hydrolytic enzymes in early rat and mouse embryo. Z. Anat. Entwickl.-Gesch. 139, 119-126 (1973)

SOLTER, D., SCHACHNER, M. Brain and sperm cell surface antigen (NS-4) in preimplantation mouse embryo. Dev. Biol. 52, 98-104 (1976)

SOLTER, D., SKREB, N., DAMJANOV, I. Extrauterine growth of mouse egg-cylinders results in malignant teratoma. Nature 227, 503-504 (1970)

STERN, S., BIGGERS, J.D., ANDERSON, E. Mitochondria and early development of the mouse. J. Exp. Zool. 176, 179-192 (1971)

STERN, P., WILLISON, K., KENNOX, E., GALFRE, G., MILSTEIN, C., SECHER, D., ZIEGLER, A., SPRINGER, T. Monoclonal antibodies as probes for differentiation and tumor associated antigens:A Forssman specifity on teratocarcinoma stem cells. Cell 14, 775-783 (1978)

STEVENS, L.C. The development of teratomas from intratesticular grafts of tubal mouse eggs. J. Embryol. Exp. Morphol. 20, 329-341 (1968)

STEVENS, L.C. The development of transplantable teratocarcinomas from intratesticular grafts of pre- and postimplantation mouse embryos. Dev. Biol. 21, 364-382 (1970)

STEVENS, L.C. Comparative development of normal and parthenogenetic mouse embryos, early testicular and ovarian teratomas, and embryoid bodies. In: SHERMAN, M.I. and SOLTER, D. (eds.), Teratomas and Differentiation, pp. 17-32, Academic Press, New York (1975)

STEVENS, L.C. Totipotent cells of parthenogenetic origin in a chimeric mouse. Nature 276, 266-267 (1978)

STEVENS, L.C. Genetic influences on teratocarcinogenesis and parthenogenesis. Prog. Clin. Biol. Res. 45, 93-104 (1981)

STEVENS, L.C., VARNUM, D.S. The development of teratomas from parthenogenetically activated ovarian mouse eggs. Dev. Biol. 37, 369-380 (1974)

STEVENS, L.C., VARNUM, D.S., EICHER, E.M. Viable chimaeras produced from normal and parthenogenetic mouse embryos. Nature 269, 515-517 (1977)

SURANI, M.A.H., BARTON, S.C., KAUFMAN, M.H. Development to term of chimaeras between diploid parthenogenetic and fertilised embryos. Nature 270, 601-603 (1977)

TARKOWSKI, A.K. Recent studies on parthenogenesis in the mouse. J. Reprod. Fertil. Suppl. 14, 31-39 (1971)

TARKOWSKI, A.K., WITKOWSKA, A., NOWICKA, J. Experimental parthenogenesis in the mouse. Nature 226, 162-165 (1970)

THEMANN, H., BACKWINKEL, K.P., TERRAHE, K. Die Permeabilität der normal und hyperergisch reagierenden Nasenschleimhaut. Eine elektronenmikroskopische Studie mit Peroxydase als Markierungssubstanz. Cytobiologie 3, 93-105 (1971)

THIBAULT, C. L'oeuf des mammifères: son developpement parthénogénetique. Annales des Sciences Naturelles: Zoologie 11, 136-219 (1949)

VAN BLERKOM, J., MOTTA, P. The Cellular Basis of Mammalian Reproduction. Urban & Schwarzenberg, München-Baltimore (1979)

VAN BLERKOM, J., RUNNER, M.N. The fine structural development of preimplantation mouse parthenotes. J. Exp. Zool. 196, 113-124 (1976)

VORBRODT, A., KONWINSKI, M., SOLTER, D., KOPROWSKI, H. Ultrastructural localization of cytoplasmic phosphatases in preimplantation mouse embryos. Folia Histochem. Cytochem. 14, 249-256 (1976)

VORBRODT, A., KONWINSKI, M., SOLTER, D., KOPROWSKI, H. Ultrastructural cytochemistry of membrane-bound phosphatases in preimplantation mouse embryos. Dev. Biol. 55, 117-134 (1977)

WACHSTEIN, M., MEISEL, E. Histochemistry of hepatic phosphatases at a physiological pH. Amer. J. Clin. Pathol. 27, 13-23 (1957)

WALDEYER, W. Über mehrfache indirekte Kernteilung. Arch. Path. Anat. 55, 132-148 (1872)

WATERS, S.E., BUTCHER, R.G. Studies on the Gomori acid phosphatase reaction: the preservation of the incubation medium. Histochem. J. 12, 191-200 (1980)

WEISSENFELS, N. Nachweis von saurer Phosphatase in gezüchteten Hühnerherzmyoblasten. Histochemie 9, 189-202 (1967)

WITKOWSKA, A. Parthenogenetic development of mouse embryos in vivo. I. Preimplantation development. J. Embryol. Exp. Morphol. 30, 519-545 (1973 a)

WITKOWSKA, A. Parthenogenetic development of mouse embryos in vivo. II. Postimplantation development. J. Embryol. Exp. Morphol. 30, 547-560 (1973 b)

WOLLENBERGER, A., SCHULZE, W. Darstellung der Na^+- und K^+-abhängigen glykosidempfindlichen Adenosintriphosphatase des Herzmuskels an der Plasmamembran des Sarkolemms. Naturwissenschaften 53, 134 (1966)

ZIOMEK, C.A., JOHNSON, M.H. Properties of polar and apolar cells from the 16-cell mouse morula. Wilhelm Roux's Arch. Dev. Biol. 190, 287-296 (1981)

7. ANHANG (Tabellen und Abbildungen)

Zeit nach HCG-Injektion	Zahl der Eileiter bzw. Uterushörner	Embryonen gesamt	durchschnittl. Zahl d. Embryonen pro Eileiter	morphol. normal gesamt	Pronuclei bzw. Einzeller	Zweizeller	Dreizeller	Vierzeller	Fünf- bis Zwölfzeller	Morulae	Blastocysten	degenerative Stadien
21 - 25 Std.	14	171 100 %	12,2	170 99,4 %	170 99,4 %	0 0 %	0 0 %	0 0 %	0 0 %	0 0 %	0 0 %	1 0,6 %
62 - 64 Std.		254 100 %	12,7	215 84,6 %	10 3,9 %	20 7,9 %	16 6,3 %	121 47,6 %	48 18,9 %	1 0,4 %	0 0 %	39 15,4 %
92 - 97 Std.		138 100 %	8,6	106 76,8 %	3 2,1 %	0 0 %	0 0 %	0 0 %	11 8,0 %	44 31,9 %	48 34,8 %	32 23,2 %

Tabelle 1 : Zahl und prozentualer Anteil der Entwicklungsstadien befruchteter Embryonen

Zeit nach HCG-Injektion	Zahl der Eileiter bzw. Uterushörner	Embryonen gesamt	durchschnittl. Zahl d. Embryonen pro Eileiter	morphol. normal gesamt	Pronuclei bzw. Einzeller	Zweizeller	Dreizeller	Vierzeller	Fünf- bis Zwölfzeller	Morulae	Blastocysten	degenerative Stadien
40 - 42 Std.	12	87 100 %	7,3	35 40,2 %	21 24,1 %	10 11,5 %	0 0 %	4 4,6 %	0 0 %	0 0 %	0 0 %	52 59,8 %
90 - 96 Std.	32	202 100 %	6,3	84 41,6 %	14 6,9 %	11 5,5 %	8 4,0 %	6 3,0 %	14 6,9 %	29 14,4 %	0 0 %	120 59,4 %
112-116 Std.	36	46 100 %	1,3	15 32,6 %	1 2,2 %	3 6,5 %	1 2,2 %	2 4,4 %	1 2,2 %	1 2,2 %	6 13,0 %	31 67,4 %

Tabelle 2 : Zahl und prozentualer Anteil der Entwicklungsstadien parthenogenetischer Embryonen

Abb.1: Elektrostimulation ovulierter Oocyten einer weiblichen Maus (NMRI-Stamm)

Ov ar und Eileiter sind nach einem dorsolateralen Schnitt aus der Peritonealhöhle hervorgeholt worden. Die Stahlnadeln zur Applikation des Stromstoßes liegen flach der aufgetriebenen Ampulle an, in der sich die ovulierten Eizellen befinden.

O = Ovar
F = Fettgewebe
⇉ = Eileiter

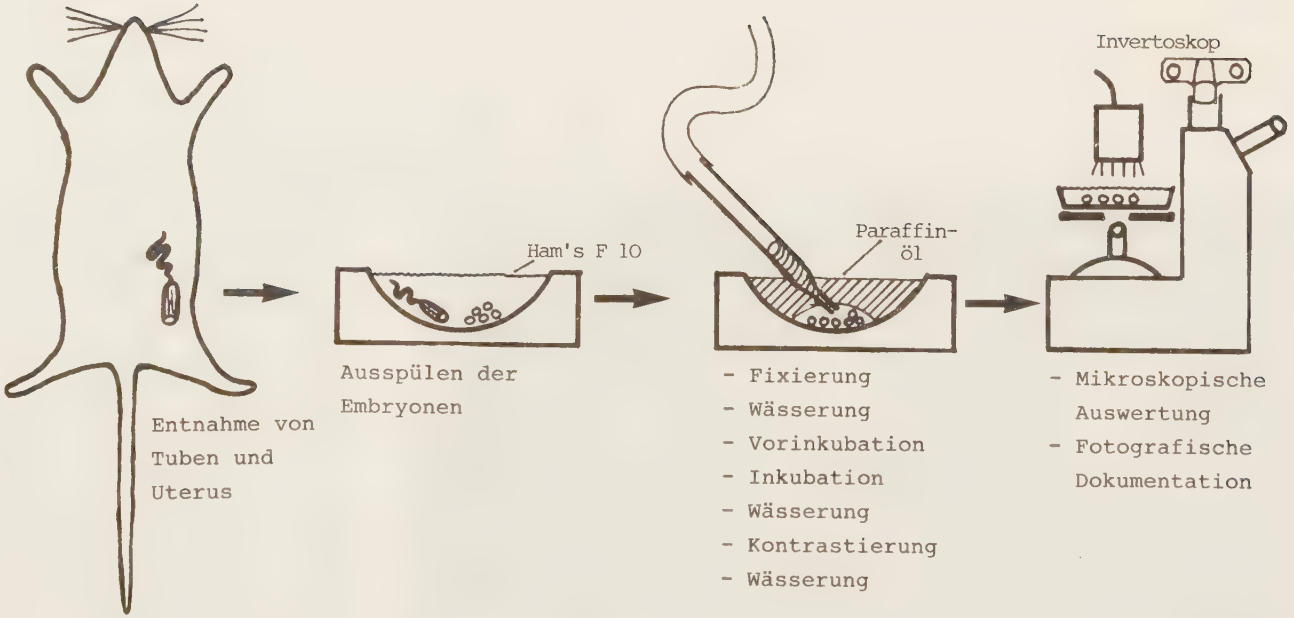
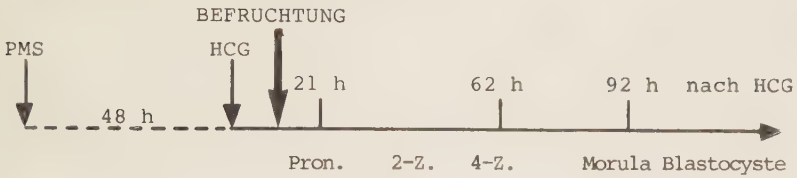
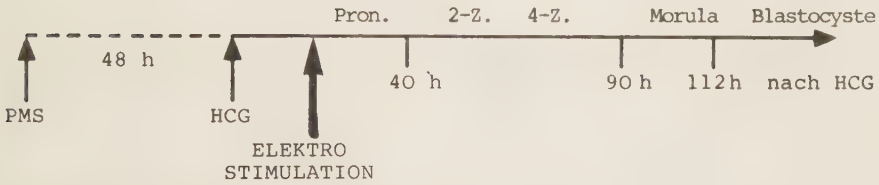


Abb 2 : Schematische Darstellung des Präparationsgangs zur zytochemischen Enzymdarstellung an Mäuseembryonen.

NORMALE EMBRYOGENESE





PARTHENOGENETISCHE ENTWICKLUNG

Abb. 3 : Zeitlicher Ablauf der präimplantativen Entwicklung normaler und parthenogenetischer Embryonen. Abkürzungen: Pron.: Pronucleus, 2-Z.: Zweizeller, 4-Z.: Vierzeller

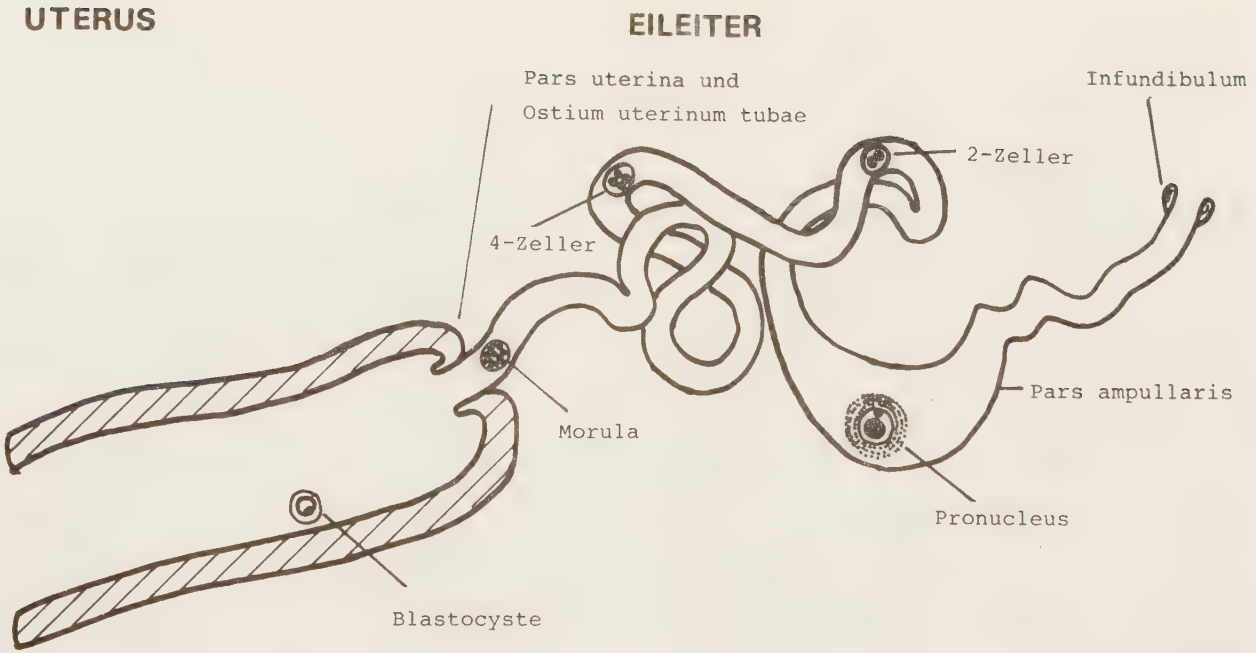
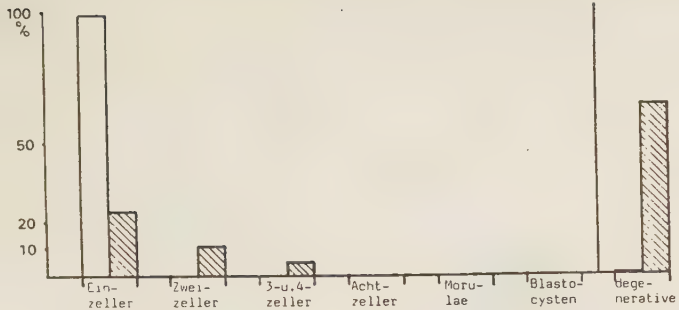
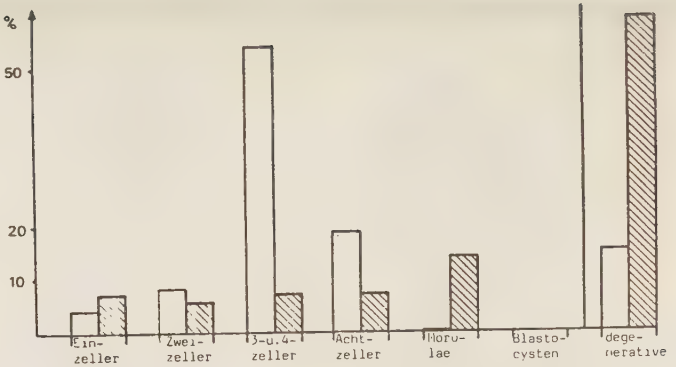


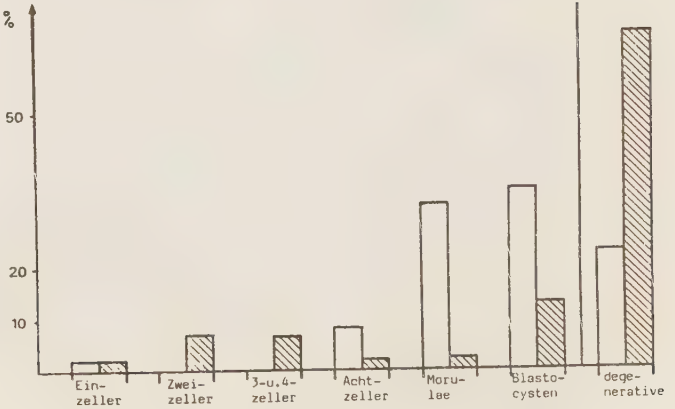
Abb. 4 : Schematische Darstellung der Entwicklung präimplantativer Embryonen innerhalb der Tuba uterina und des Uterus der Maus.



a: Erste Zeitstufe - 21 Std. nach HCG: Normale Embryogenese
- 40 Std. nach HCG: Parthenogenese



b: Zweite Zeitstufe - 62 Std. nach HCG: Normale Embryogenese
- 90 Std. nach HCG: Parthenogenese



c: Dritte Zeitstufe -92 Std. nach HCG: Normale Embryogenese
-112 Std. nach HCG: Parthenogenese

Abb. 5: Prozentualer Anteil der Entwicklungsstadien an der Gesamtzahl gewonnener Embryonen.

Weiß: normale Embryogenese

Schraffiert: Parthenogenese

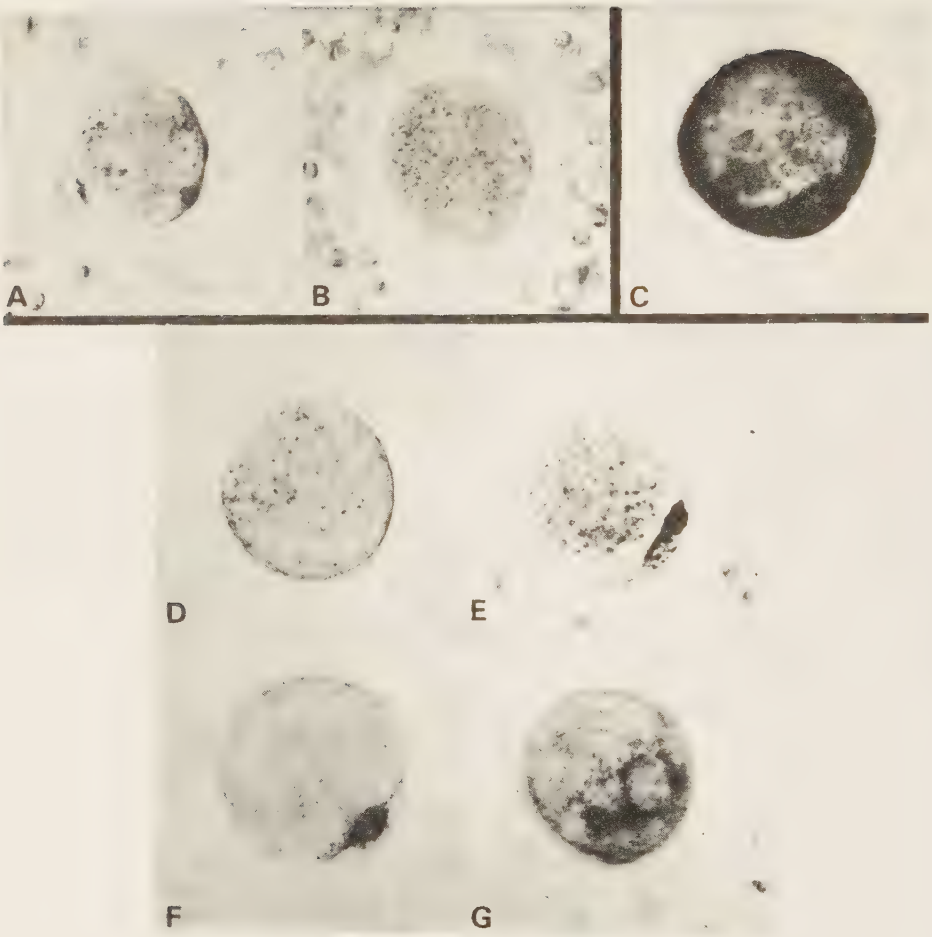


Abb. 6: Kontrollversuche zur Spezifität des zytochemischen Nachweises der Mg^{2+}-abhängigen ATPasen an Pronuclei der normalen Embryogenese 21 Std. nach HCG.
A,B: Fixierte Pronuclei vor der Inkubation;
C: normale fünfminütige Inkubation;
D: Kontrolle (Inkubation ohne ATP; 5 Min.);
E: Kontrolle (Inkubation ohne Magnesium; 5 Min.);
F,G: Kontrolle (Mg^{2+}-freies Inkubationsgemisch; 10 Min.) (Vergrößerung ca. 400-fach)

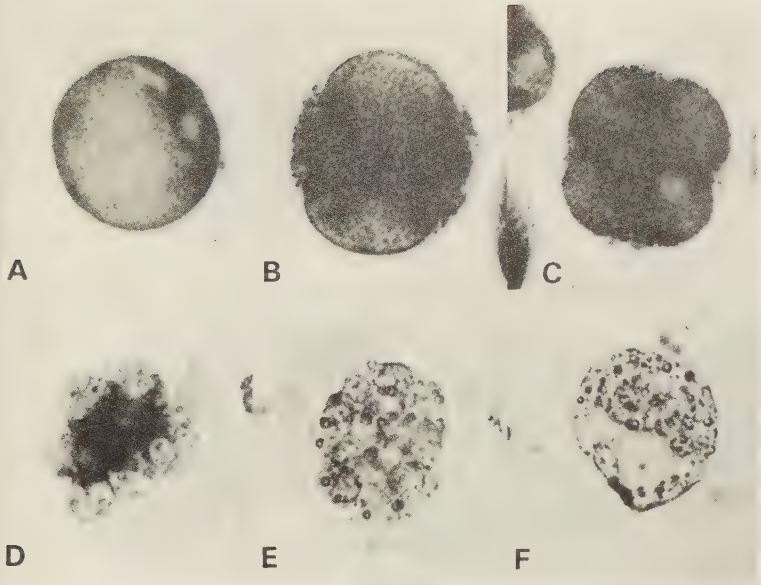


Abb. 7: Mg^{2+}-ATPase-Aktivität verschiedener Entwicklungsstadien der normalen Embryogenese.
A: Pronucleus, 21 Std. nach HCG:
B: Zweizeller, 62 Std. nach HCG;
C: Vierzeller, 62 Std. nach HCG;
D: frühe Morula, 92 Std. nach HCG;
E: Morula, 92 Std. nach HCG;
F: Blastocyste, 92 Std. nach HCG.
(ca. 400-fach)

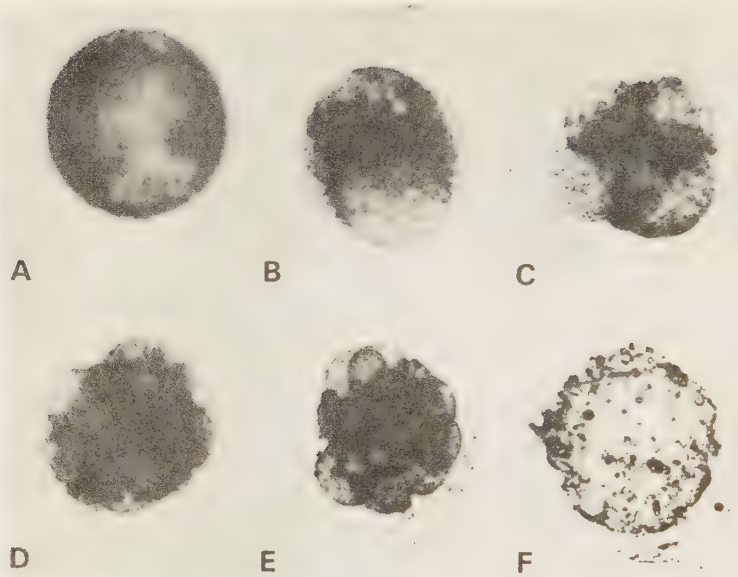


Abb. 8: Mg^{2+}-ATPase-Aktivität verschiedener Entwicklungsstadien der parthenogenetischen Embryogenese.
A: Pronucleus, 40 Std. nach HCG;
B: Zweizeller, 90 Std. nach HCG;
C: Vierzeller, 90 Std. nach HCG;
D: Achtzeller, 90 Std. nach HCG;
E: frühe Morula, 90 Std. nach HCG;
F: Blastocyste, 112 Std. nach HCG.
(ca. 400-fach)

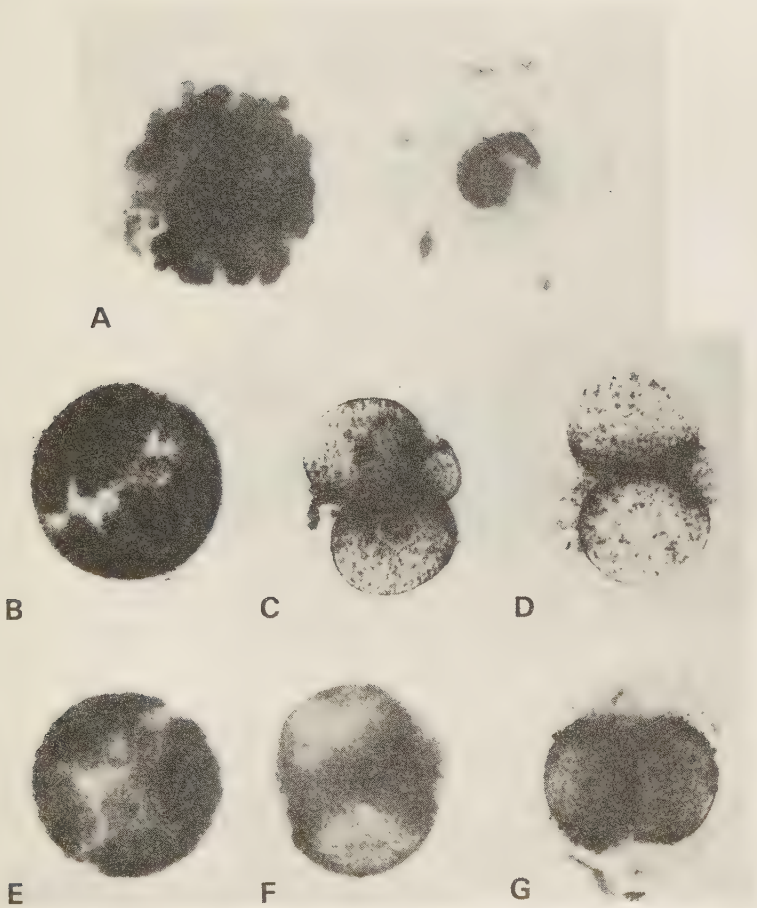


Abb. 9: Nachweis Mg^{2+}-abhängiger ATPasen.

A: unbefruchtete Eizellen mit Corona radiata (21Std.n.HCG)
B: befruchteter Einzellembryo (21 Std. nach HCG);
C,D: Zweizellembryo (normale Embryogenese; (62Std.n.HCG);
E: parthenogenetischer Einzellembryo (40 Std. nach HCG);
F: parthenogenetischer Zweizellembryo (40 Std.nach HCG);
G: parthenogenetischer Zweizellembryo (90 Std.nach HCG).

A = (ca. 200-fach)
B-G = (ca. 400-fach)

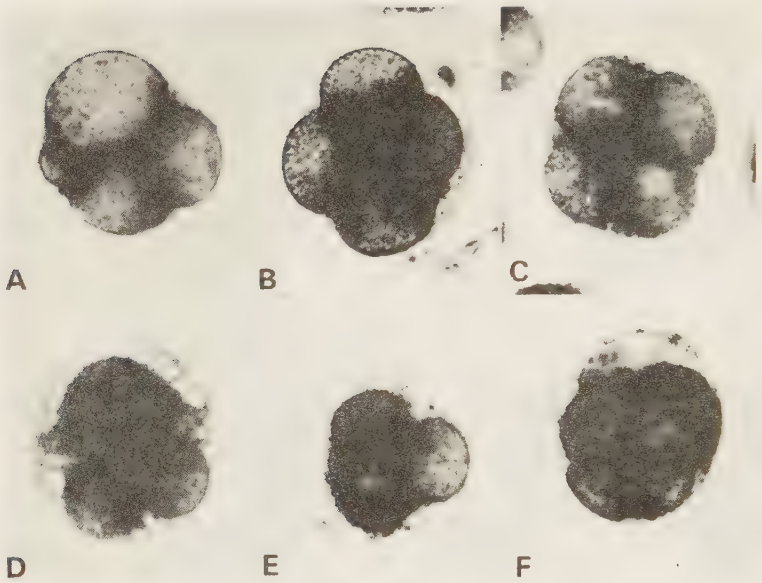


Abb.10: Aktivität Mg^{2+}-abhängiger ATPasen.

A: Dreizeller (normale Embryogenese; 62 Std.n.HCG);
B, C: Vierzeller (normale Embryogenese; 62 Std.n.HCG);
D: Dreizeller (Parthenogenese; 90 Std. nach HCG);
E,F: Vierzeller (Parthenogenese; 90 Std.nach HCG).

(ca. 400-fach)

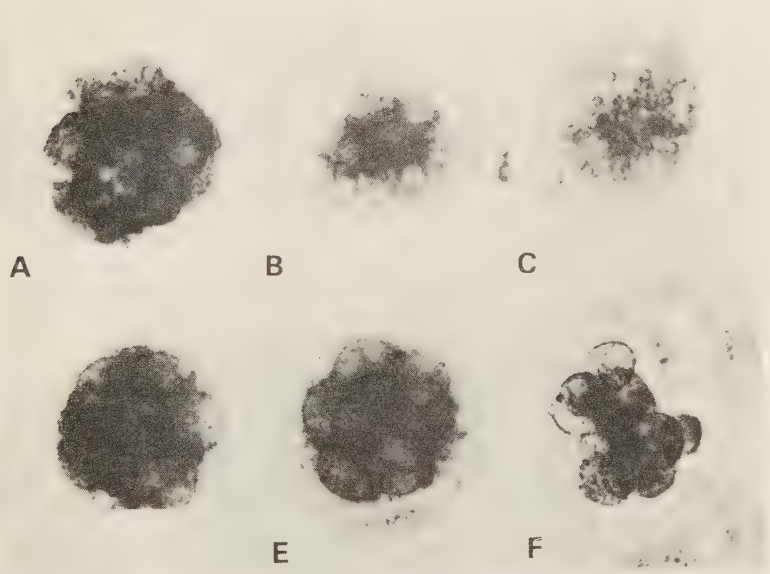


Abb. 11: Nachweis Mg^{2+}-abhängiger ATPasen.

A: Achtzeller (normale Embryogenese; 62 Std.n.HCG);
B: frühe Morula (normale Embryogenese,92 Std.n.HCG);
C: Morula (normale Embryogenese; 92 Std.nach HCG);
D,E: Achtzeller (Parthenogenese; 90 Std.nach HCG);
F: Zwölfzeller (Parthenogenese), von dem die Zona pellucida mechanisch entfernt wurde (90 Std. nach HCG).

(ca. 400-fach)

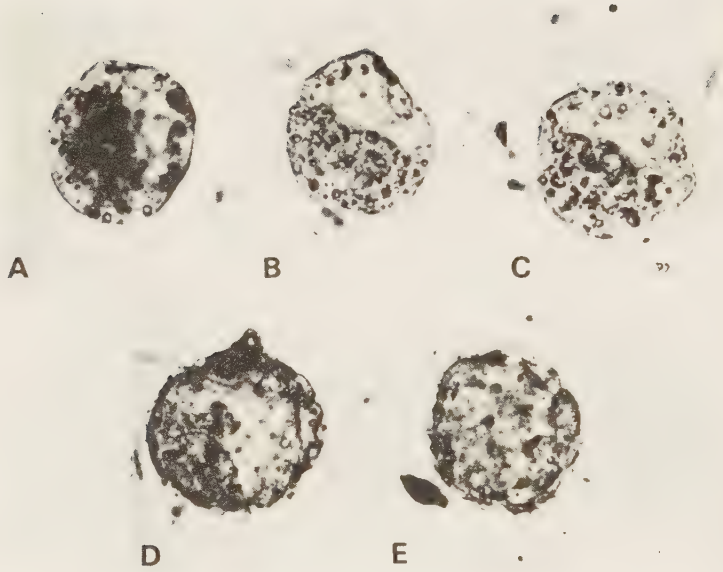


Abb. 12: Nachweis Mg^{2+}-abhängiger ATPasen.

A,B,C: Blastocysten (normale Embryogenese; 92 Std. nach HCG);
D,E: Blastocysten (Parthenogenese; 112 Std. nach HCG).

(ca. 400-fach)

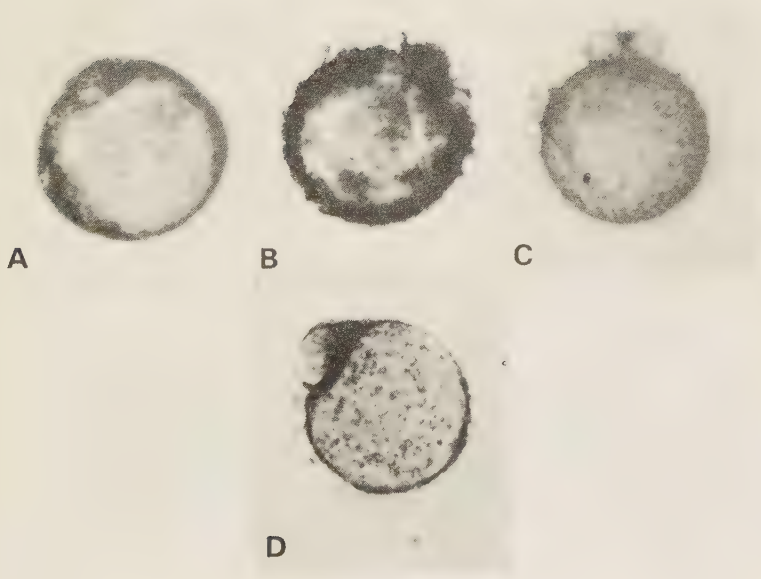


Abb.13: Aktivität Mg^{2+}-abhängiger ATPasen;

Einzellembryonen, die zu verschiedenen Zeitpunkten der normalen Embryogenese gewonnen wurden im Vergleich.

A: 21 Std. nach HCG;
B,C: 62 Std. nach HCG;
D: 92 Std. nach HCG.

(ca. 400-fach)

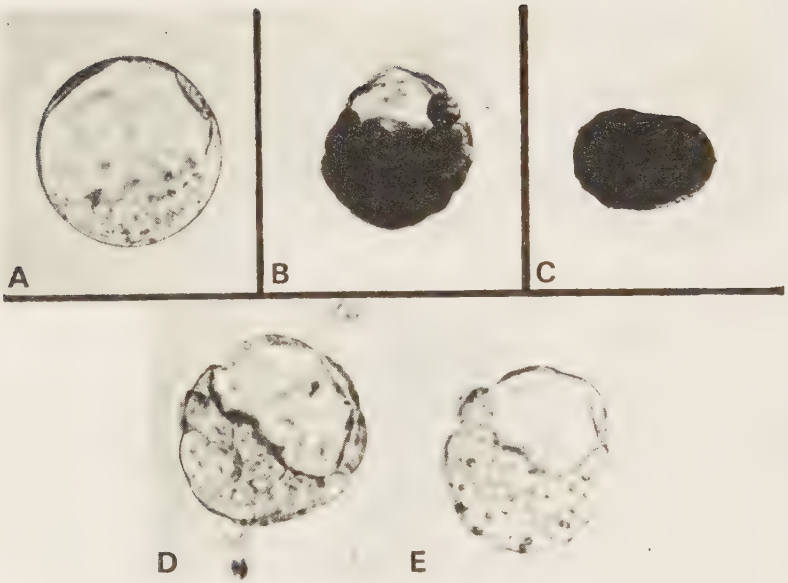


Abb. 14: Saure Phosphatase-Nachweis:

A: Blastocyste (normale Embryogenese) nach Fixation ohne Inkubation;
B: Blastocyste (normale Embryogenese) nach Inkubation;
C: zum Vergleich inkubierte Genitaltraktzelle der Maus
D,E: Kontrollversuche zur Spezifität der Enzymdarstellung, und zwar
D: Inkubation ohne Substrat (Blastocyste, (normale Embryogenese),
E: Inkubation mit Enzymblocker Natriumfluorid (Blastocyste, normale Embryogenese).

(ca. 400-fach)

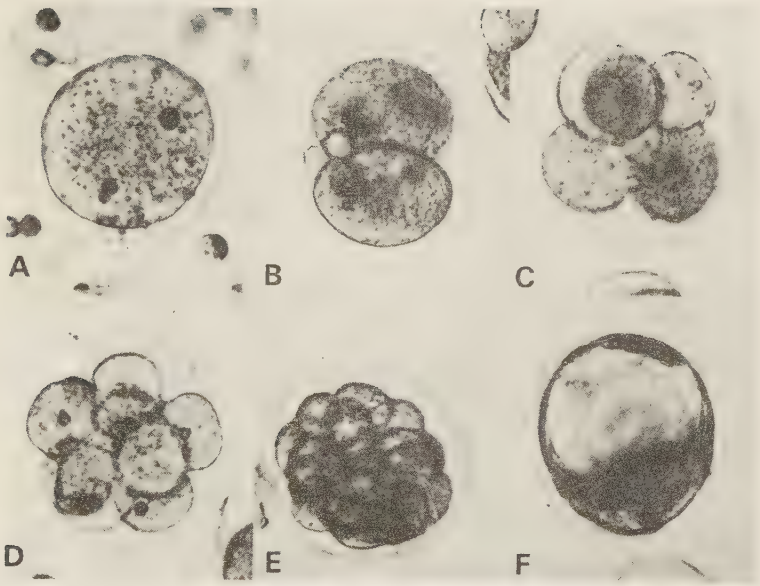


Abb.15: SPase-Aktivität verschiedener Stadien der normalen Embryogenese.

A: Pronucleus (21 Std. nachHCG);
B: Zweizeller (62 Std. nach HCG);
C: Vierzeller (62 Std. nach HCG);
D: Achtzeller (62 Std. nach HCG);
E: frühe Morula (92 Std. nach HCG);
F: Blastocyste (92 Std. nach HCG).

(ca. 400-fach)

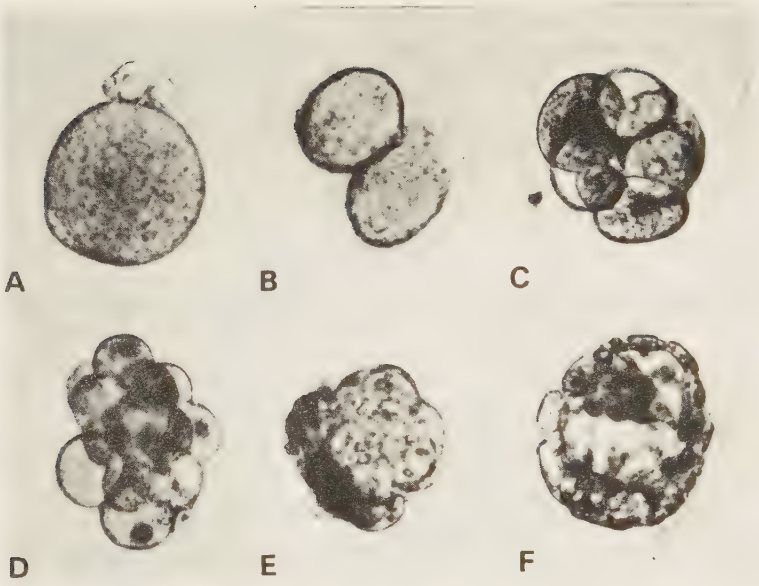


Abb. 16: SPase-Aktivität verschiedener Stadien der parthenogenetischen Entwicklung.

A: Pronucleus (40 Std. nach HCG);
B: Zweizeller (90 Std. nach HCG);
C: Sechszeller(90 Std. nach HCG);
D: frühe Morula (90 Std. nach HCG);
E: Morula (112 Std. nach HCG);
F: Blastocyste (112 Std. nach HCG).

(ca. 400-fach)

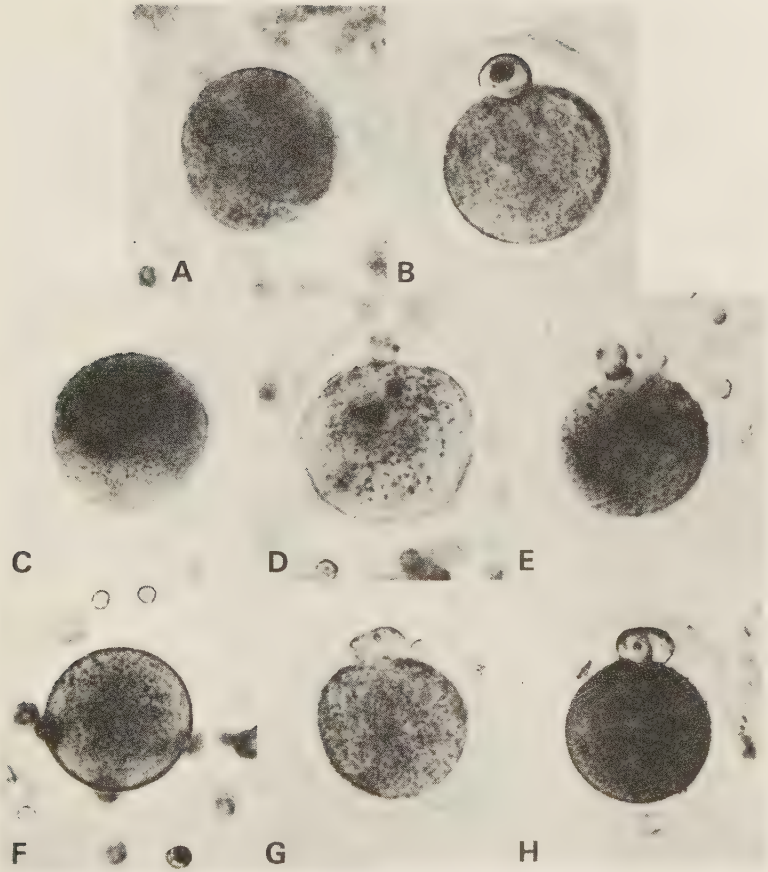


Abb. 17: SPase-Nachweis.

A,B: unbefruchtete Eizellen (21 Std. nach HCG);
C,D,E: befruchtete Pronuclei(21 Std. nach HGG);
F,G,H: parthenogenetische Pronuclei (40Std.n.HCG).

(ca. 400-fach)

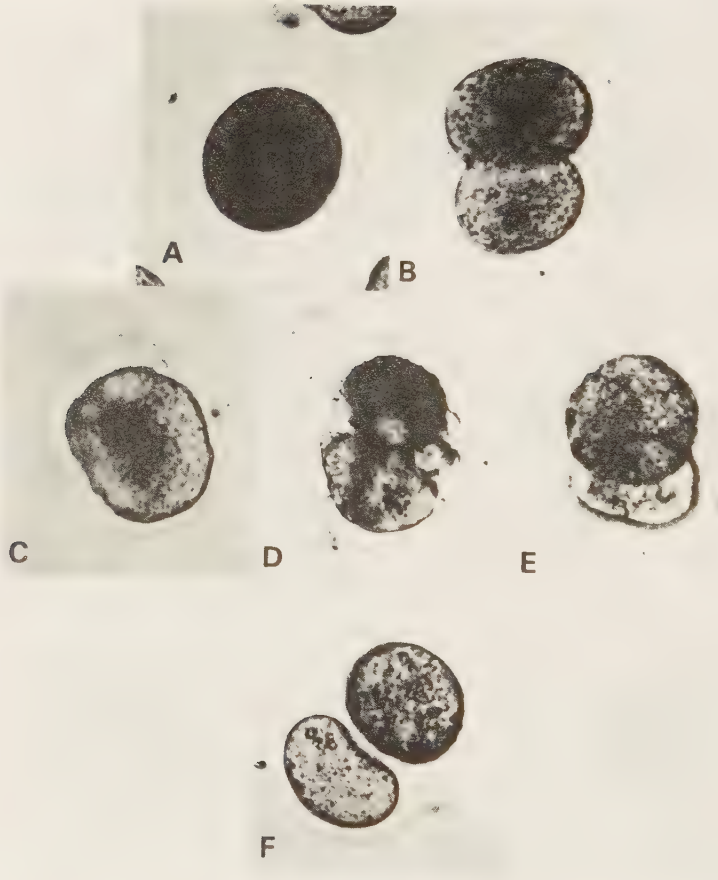


Abb.18: SPase-Nachweis.

A: Pronucleus (normale Embryogenese; 62Std.n.HCG);
B: Zweizeller (normale Embryogenese; 62Std.n.HCG);
C: Pronucleus (Parthenogenese; 90 Std. nach HCG);
D: Zweizeller (Parthenogenese; 40 Std. nach HCG);
E: Zweizeller (Parthenogenese; 90 Std. nach HCG);
F: Zweizeller (Parthenogenese;112 Std. nach HCG).

(ca. 400-fach)

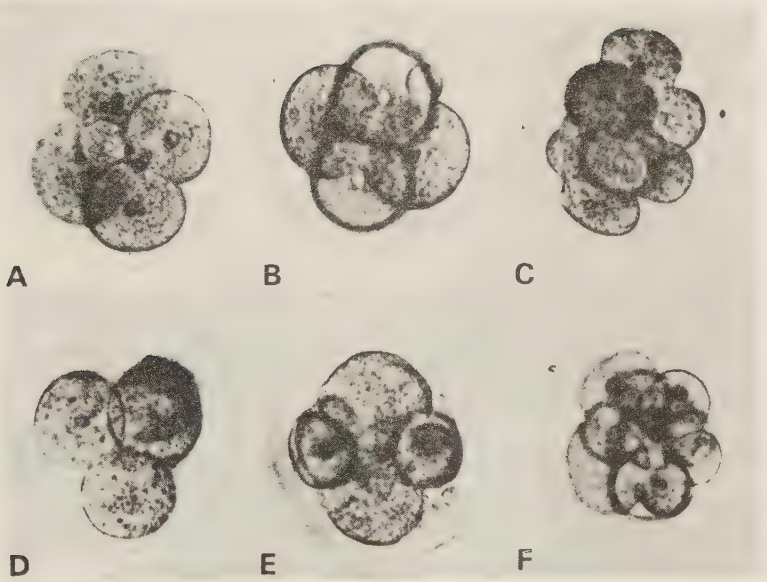


Abb. 19: SPase-Nachweis.

A,B: Vierzeller (normale Embryogenese; 62 Std. nach HCG);
C: Achtzeller (normale Embryogenese; 62 Std. nach HCG);
D,E: Vierzeller (Parthenogenese; 90 Std. nach HCG);
F: Zehnzeller (Parthenogenese; 90 Std. nach HCG).

(ca. 400-fach)

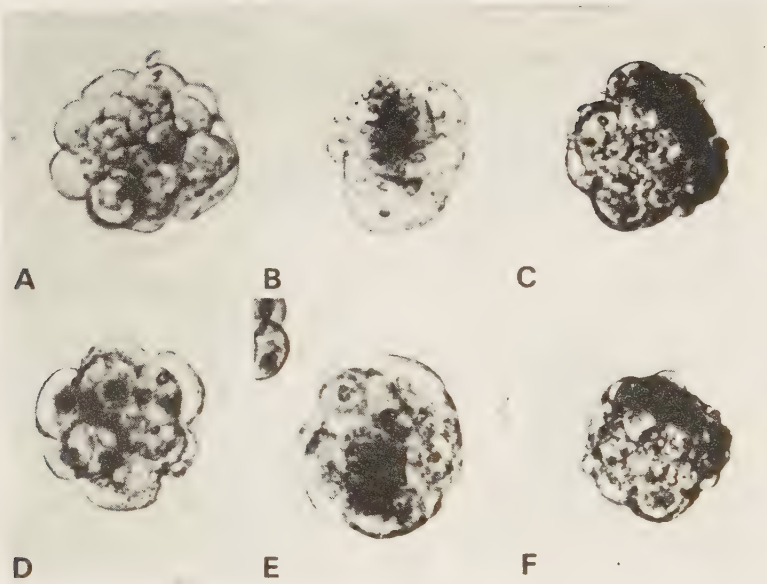


Abb.20: SPase-Nachweis.

A: Frühe Morula (normale Embryogenese; 92 Std. nach HCG);
B, C: Morula (normale Embryogenese; 92 Std. nach HCG);
D: Frühe Morula (Parthenogenese; 90 Std. nach HCG);
E: Morula (Parthenogenese; 90 Std. nach HCG);
F: Morula (Parthenogenese; 112 Std. nach HCG).

(ca. 400-fach)

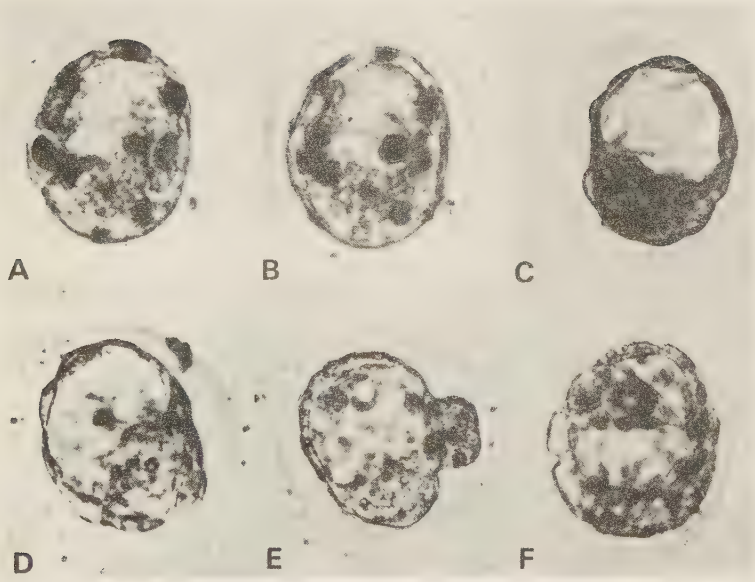


Abb. 21: SPase-Nachweis.

A,B: Blastocyste in verschiedenen Schärfeebenen, (normale Embryogenese; 92 Std. nach HCG);
C: Blastocyste (normale Embryogenese; 92 Std. nach HCG);
D,E,F: Blastocysten (Parthenogenese; 112 Std. nach HCG).

(ca. 400-fach)

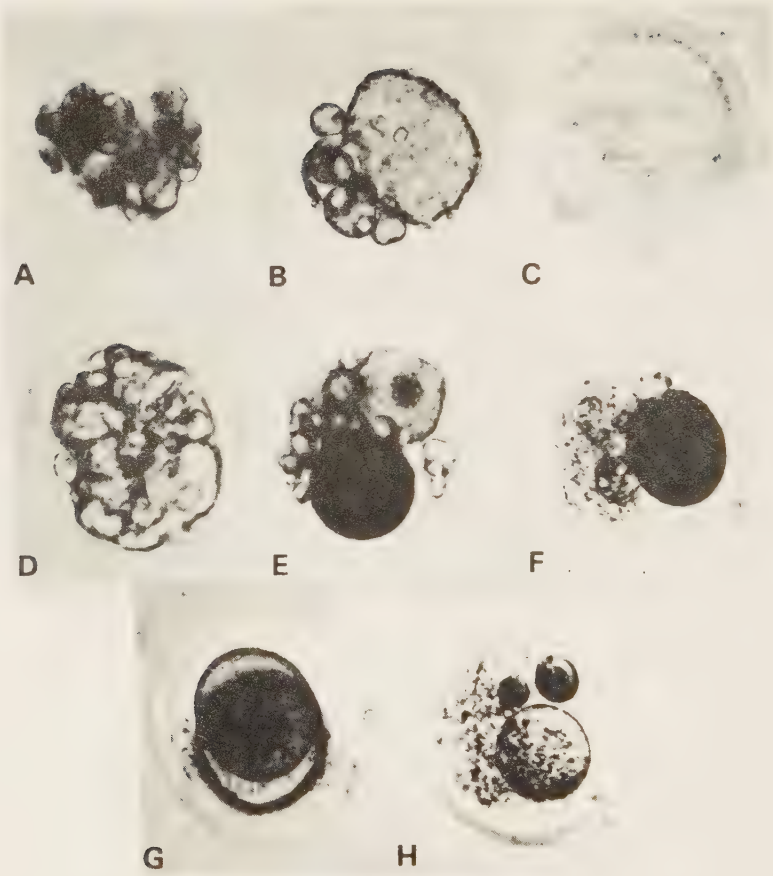


Abb. 22: SPase-Darstellung bei morphologisch abnormen und degenerativen Stadien.

A: normale Embryogenese (21 Std. nach HCG);
B,C: normale Embryogenese (62 Std. nach HCG);
D: Parthenogenese (40 Std. nach HCG);
E,F,G: Parthenogenese (90 Std. nach HCG);
H: Parthenogenese (112 Std. nach HCG).

(ca. 400-fach)

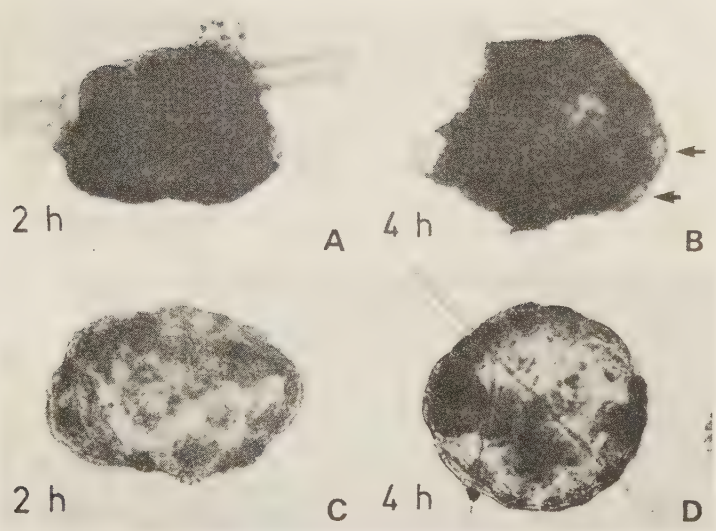


Abb. 23: Lichtmikroskopischer Nachweis von endozytierter Meerrettichperoxidase in geschlüpften Blastocysten.

A, B: Normale Embryogenese;
C, D: Parthenogenese.

(ca. 400-fach)

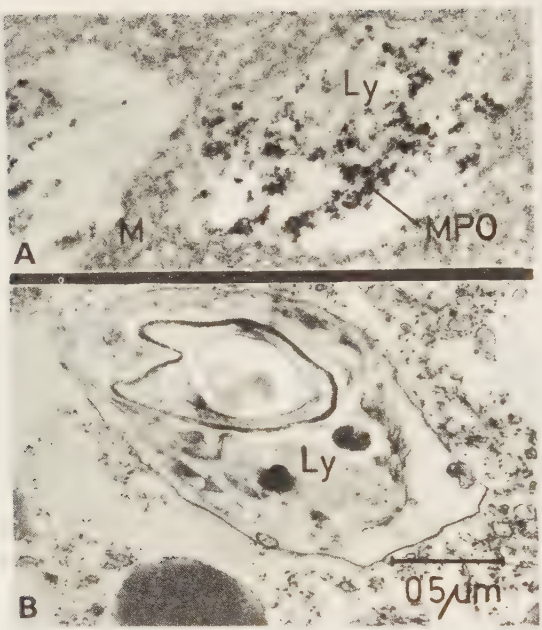


Abb. 24: Elektronenmikroskopischer Nachweis von endozytierter Meerrettichperoxidase in Trophoblastzellen einer normalen (A) und parthenogenetischen (B) Blastocyste.

Ly: Lysosomen, M: Mitochondrium, MPO: Meerrettichperoxidase.

(ca. 40.000-fach)

Erläuterung der verwendeten Abkürzungen:

sPase:	saure Phosphatase
ATPase:	Adenosintriphosphatase
PMS:	Pregnant mare's serum
HCG:	Humanes Choriongonadotropin
IU:	Internationale Einheiten
MPO:	Meerrettichperoxidase
ICM:	Innere Zellmasse bei Blastocysten: Embryoblast

Herrn Prof. Dr. G. Röhrborn danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Versuchstiere.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. J. Gebauer für seine wertvollen Anregungen, seine Unterstützung bei der Durchführung der Experimente und für seine freundliche Gesprächsbereitschaft.

Auch allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik und Anthropologie, die mir bei der Arbeit behilflich waren, bin ich zu Dank verpflichtet.

LEBENSLAUF

Martin Claßen

10. Februar 1956	Als Sohn des Rektors Franz Claßen und seiner Ehefrau Hildegard, geb. Thönnessen, in Essen-Werden geboren
April 1962	Einschulung in die Bernhardschule in Essen-Fischlaken
April 1966	Wechsel zum Städtischen Neusprachlichen Gymnasium Essen-Werden
Juni 1974	Reifeprüfung
Oktober 1974-März 1975	Studium der Physik an der Universität Düsseldorf
April 1975-September 1976	Ableisten des Zivildienstes am St. Josef-Krankenhaus Essen-Werden, dabei Ausbildung zum Pflegehelfer
September 1976	Staatliches Examen als Pflegehelfer
Oktober 1976-September 1981	Studium der Humanmedizin an der Universität Düsseldorf
Oktober 1981-September 1982	Praktisches Jahr im Lukaskrankenhaus Neuss (Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Düsseldorf), Wahlfach Pädiatrie
Oktober 1982	Ärztliche Prüfung in Düsseldorf und Neuss
Oktober 1982-März 1983	Dissertationsarbeit am Institut für Humangenetik der Universität Düsseldorf
seit April 1983	Assistenzarzt in der Abteilung für Anästhesiologie des Johanna-Etienne-Krankenhauses in Neuss

Copy + Sofortdruck GmbH
Bilker Allee 173 Telefon 0211/317020